



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

**2 형 당뇨병 치료를 위한 신규 11 $\beta$ -HSD1 저해제의 개발**

**Development of a novel 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1  
inhibitor for the potential treatment of type 2 diabetes**

**2016 년 2 월**

서울대학교 대학원  
약학과 약품제조화학 전공  
류 제 호

## 국문 초록

11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1)은 NADPH 의존적 환원 효소로서 glucocorticoid의 비활성형인 cortisone을 활성형인 cortisol로 전환하는데 핵심적인 효소이다. 11 $\beta$ -HSD1은 간, 지방, 근육, 뇌 조직 등에 주로 분포하며 해당 조직에서 glucocorticoid의 활성을 조절하는 역할을 수행한다. 만성적으로 간과 지방 조직 내의 cortisol 농도가 높을 경우 인슐린 의존적 당 흡수 감소, 인슐린 저항성 증가, 간에서의 당신생 증가, 지방분해 증가 등이 유도되어 당뇨, 비만, 고지혈증 등이 야기된다. 이러한 cortisol과 대사질환 사이의 상관관계가 밝혀지면서 11 $\beta$ -HSD1을 억제하는 것이 2형 당뇨 및 대사증후군을 치료할 수 있는 유망한 전략으로서 주목 받게 되었다.

2형 당뇨병 치료제로 유용한 신규의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor를 개발하기 위하여 먼저 내부의 library 화합물에 대한 high throughput screening을 수행하여 유효물질 **1** (*N*-cyclohexyl-6-(piperidin-1-yl)picolinamide)을 도출하였다. 화합물 **1**의 in-vitro potency와 낮은 대사안정성을 개선하기 위해 docking 연구 결과를 토대로 cyclohexane ring과 piperidine ring에 대한 구조적인 변형을 수행하였다. 유효물질 **1**의 cyclohexane ring 대신 hydroxy-adamantyl ring을 도입하여 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성을 효과적으로 개선하였으며 piperidine ring 대신 phenyl ring의 4번 위치가 치환된 *N*-phenyl-piperazine moiety를 도입하여 대사안정성을 상당히 증가시킬 수 있었다. 선도물질로 선정된 화합물 **25** (6-(4-(4-cyanophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide)는 mouse ex-vivo pharmacodynamic (PD) model에서 간과 지방 조직의 11 $\beta$ -HSD1 활성을 유의적으로 억제하였으며 HF/STZ mouse에 경구투여 시 공복 혈당 및 혈중 인슐린 수준을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

그러나 선도물질 **25**는 매우 낮은 bioavailability와 짧은 PD 효능의 지속성 때문에 in-vivo efficacy를 발현하기 위해 많은 경구투여 용량과 1일 2회 투여가 필요하였다. 화합물 **25**의 in-vitro potency와 함께 pharmacokinetic (PK) profile을 개선하기 위하여 *N*-phenylpiperazine moiety에 대한 추가적인 최적화 연구를 진행하였다. 선도물질 **25**의 phenyl ring의 4번 위치에 치환된 cyano group을 methylsulfonyl group으로 대체한

결과 enzyme assay 및 cellular assay에서의 활성이 약 2배 증가하였으며 piperazine ring의 2번 위치에 (*R*)-methyl group을 도입한 결과 PK/PD profile이 크게 개선되었다. 이렇게 도출된 화합물 **57** (*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-2-methyl-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)picolinamide)은 기존 대비 낮은 용량을 1일 1회 경구 투여한 *ob/ob* mouse 시험에서 혈당, LDL cholesterol 및 triglyceride 수준을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타나 우수한 in-vivo efficacy가 확인되었다.

화합물 **57**은 선도물질 **25**에 대비하여 in-vitro potency 및 PK/PD profile이 크게 개선되었으나 비교적 낮은 농도에서 CYP3A4 및 hERG channel을 억제한다는 문제를 가지고 있었다. CYP 및 hERG inhibition 이슈를 회피하기 위하여 picolinamide core에 대한 변형을 통해 heterocyclic amine의 basicity를 감소시키기로 계획하였다. 화합물 **57**의 pyridine ring을 pyrimidine ring으로 변형한 결과 cellular potency와 ex-vivo PD 효능이 다소 감소하였으나, 감소된 lipophilicity를 보완하기 위해 phenyl ring의 2번 위치에 fluoro group을 추가로 도입한 결과 cellular potency가 2배 이상 증가하면서 PD 효능 역시 크게 개선되었다. 이렇게 도출된 화합물 **77** (2-((*R*)-4-(2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide)은 CYP inhibition과 PXR activation의 문제가 없고 hERG profile 역시 개선되었으며 활성 및 선택성이 우수한 신규 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor로 확인되었다. 화합물 **77**은 mouse, rat, dog에서 모두 탁월한 PK profile을 보여주었고 다양한 용량으로 수행한 mouse ex-vivo PD 시험에서 화합물 **57** 대비 3배 정도 개선된 우수하고 지속적인 효능을 나타내었다. 마지막으로 *ob/ob* mouse 시험에서 화합물 **77**은 혈당, 당화혈색소, lipid profile을 유의적으로 개선하였으며 metformin과의 병용 투여에 의한 효능의 증가 역시 보여주었다.

화합물 **77**은 GLP 독성시험을 진행하기 위한 전임상 후보물질로 선정되었으며 임상 시험을 거쳐 효과적인 혈당 감소 효능뿐 아니라 lipid profile 개선 등의 추가적인 장점을 보유한 2형 당뇨병 신약으로 개발될 것이 기대된다.

---

주요어: 11 $\beta$ -HSD1, Glucocorticoid, Cortisol, Type 2 diabetes, Metabolic syndrome, Hyperlipidemia, Picolinamide, Pyrimidine-4-carboxamide, Structure-activity relationship, Metabolic stability, Pharmacodynamic, Pharmacokinetic, CYP inhibition, hERG blocking, PXR activation, *Ob/ob* mice.

학번: 2007-30460

# 목 차

국문 초록 .....	i
목 차 .....	iv
Table 목록 .....	vi
Figure 목록 .....	vii
Abbreviations .....	viii
<b>I. 서 론</b> .....	1
1. 당뇨병의 원인 및 현황 .....	1
2. 신규 2형 당뇨 치료제의 필요성 .....	2
3. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 .....	4
4. 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor 개발 동향 .....	6
5. 연구 배경 및 목적 .....	7
<b>II. 유효물질 최적화 연구</b> .....	10
1. 연구 방향성 .....	10
2. 신규 화합물의 합성 .....	12
3. 활성 검색 및 구조-활성 관계 연구 .....	17
4. PD 및 질환모델 시험 .....	23
<b>III. 선도물질 최적화 연구</b> .....	26
1. 연구 방향성 .....	26
2. 신규 화합물의 합성 .....	27
3. 활성 검색 및 구조-활성 관계 연구 .....	33
4. PK, PD 및 질환모델 시험 .....	39
<b>IV. 전임상 후보물질 도출 연구</b> .....	43
1. 연구 방향성 .....	43
2. 신규 화합물의 합성 .....	45
3. 활성 검색 및 구조-활성 관계 연구 .....	48
4. 후보물질 profiling 및 질환모델 시험 .....	53

<b>V. 결 론</b>	59
1. 유효물질 최적화 연구	59
2. 선도물질 최적화 연구	60
3. 전임상 후보물질 도출 연구	61
<b>VI. 실험</b>	63
1. Chemistry	63
2. 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay	111
3. 11 $\beta$ -HSD1 cell-based assay	111
4. Mouse <i>ex vivo</i> pharmacodynamic assay	111
5. HF/STZ mouse model	112
6. <i>Ob/ob</i> mouse model	112
<b>VII. 참고 문헌</b>	114
<b>Abstract</b>	120

## Table 목록

Table 1	Classification for the oral anti-diabetic agents .....	3
Table 2	<i>In vitro</i> data of the cyclohexyl ring modified derivatives .....	18
Table 3	<i>In vitro</i> data of the substituted piperidine derivatives .....	20
Table 4	<i>In vitro</i> data of the <i>N</i> -substituted piperazine derivatives .....	22
Table 5	<i>In vitro</i> data of the phenylpiperazine modified derivatives .....	34
Table 6	<i>In vitro</i> data of the phenyl ring modified derivatives .....	36
Table 7	<i>In vitro</i> data of methyl substituted piperazine derivatives .....	38
Table 8	<i>In vitro</i> inhibition and <i>in vivo</i> PK data of compounds <b>47</b> , <b>57</b> , and <b>61</b> .....	39
Table 9	<i>Ex vivo</i> PD data of compounds <b>47</b> , <b>57</b> , and <b>61</b> .....	40
Table 10	CYP and hERG inhibition data of compound <b>57</b> .....	44
Table 11	<i>In vitro</i> and <i>ex vivo</i> data of 4-(methylsulfonyl)phenylpiperazine derivatives .....	49
Table 12	<i>In vitro</i> and <i>ex vivo</i> data of pyrimidine-4-carboxamide derivatives .....	52
Table 13	<i>In vitro</i> inhibition data of compound <b>77</b> .....	53
Table 14	CYP and hERG inhibition and PXR activation data of compound <b>77</b> .....	54
Table 15	<i>Ex vivo</i> PD data of compound <b>77</b> .....	55
Table 16	<i>In vivo</i> PK data of compound <b>77</b> .....	56
Table 17	The effect of metformin, compound <b>77</b> , and the combination on lipid profiles in <i>ob/ob</i> mice .....	58



## Figure 목록

Figure 1	Interconversion of cortisone and cortisol by 11 $\beta$ -HSD enzymes .....	5
Figure 2	Chemical structures of the previously reported 11 $\beta$ -HSD1 inhibitors .....	7
Figure 3	Chemical structures of hit compound <b>1</b> and BMS30 .....	10
Figure 4	Overlap of BMS30 and compound <b>1</b> in the binding site of human 11 $\beta$ -HSD1 .....	11
Figure 5	<i>Ex vivo</i> pharmacodynamic data for compound <b>25</b> .....	24
Figure 6	Effect of compound <b>25</b> on fasting blood glucose and insulin levels in HF/STZ mice .....	25
Figure 7	Chemical structure and biological profiles of lead compound <b>25</b> .....	26
Figure 8	Effect of compound <b>57</b> on non-fasting plasma glucose levels and lipid profiles in <i>ob/ob</i> mice .....	42
Figure 9	Chemical structure and biological profiles of advanced lead <b>57</b> .....	43
Figure 10	Effect of metformin, compound <b>77</b> , and the combination on glucose levels in <i>ob/ob</i> mice .....	57

## Abbreviations

Ac	: acetyl
ACN	: acetonitrile
AUC	: area under the curve
BINAP	: 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
br	: broad
Bu	: butyl
CL	: clearance
CYP	: cytochrome P450
d	: doublet
dba	: dibenzylideneacetone
DCE	: 1,2-dichloroethane
DCM	: dichloromethane
dd	: doublet of doublet
DIPEA	: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMEM	: Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DPP-4	: dipeptidyl peptidase-4
dppf	: 1,1'-ferrocenediyl-bis(diphenylphosphine)
dt	: doublet of triplet
EIA	: enzyme immunoassay
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
EPF	: epididymal fat
ESI	: electrospray ionization
Et	: ethyl
GLP-1	: glucagon-like peptide-1
HBTU	: <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HDL	: high-density lipoprotein

HEK	: human embryonic kidney
hERG	: human ether-a-go-go related gene
hHSD1	: human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1
hHSD2	: human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2
IC <sub>50</sub>	: half maximal inhibitory concentration
iv	: intravenous injection
LDA	: lithium diisopropylamide
LDL	: low-density lipoprotein
m	: multiplet
MC	: methylene chloride
Me	: methyl
mHSD1	: mouse 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1
MLM	: mouse liver microsome
MPLC	: medium pressure liquid chromatography
MS	: mass spectrometry
MST	: metabolic stability test
NAD	: nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NMR	: nuclear magnetic resonance
PD	: pharmacodynamic
PDB	: protein data bank
Ph	: phenyl
PK	: pharmacokinetic
po	: oral administration
ppm	: parts per million
Pr	: propyl
PXR	: pregnane X receptor
s	: singlet
SE	: standard error
SEM	: standard error of the mean

SGLT-2	: sodium-dependent glucose cotransporter-2
STZ	: streptozotocin
t	: triplet
TBAF	: tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
TEA	: triethylamine
TFA	: trifluoroacetic acid
THF	: tetrahydrofuran
TLC	: thin layer chromatography
TMS	: tetramethylsilane
TMSCF <sub>3</sub>	: trimethyl(trifluoromethyl)silane
tt	: triplet of triplet
TZD	: thiazolidinedione

# I. 서론

## 1. 당뇨병의 원인 및 현황

당뇨병은 인슐린의 분비 또는 기능에 이상이 있거나 이 두 가지의 복합적인 문제가 발생하여 장기간 고혈당이 유지되는 질병이다. 인슐린은 췌장의  $\beta$  cell에서 분비되는 호르몬으로서 에너지 생성을 위해 혈중의 포도당을 근육 및 조직의 세포 내로 흡수시키는 역할을 수행한다. 그러나 인슐린의 작용이 부족할 경우 혈중 포도당이 세포로 이동하지 못하고 혈액 중에 정체되어 고혈당 및 당뇨가 초래된다. 결국 당뇨병 환자에게서 발견되는 비정상적인 탄수화물, 지방, 단백질 대사는 조직에서 인슐린의 비정상적인 작용에 의해 나타난다.<sup>1</sup>

당뇨병에 의해 비정상적인 고혈당과 대사 이상이 장기간 지속될 경우 뇌졸중, 심장병 등의 대혈관 합병증과 retinopathy, neuropathy, nephropathy, gangrene 및 하지 감염, 말초혈관 질환 등의 소혈관 합병증이 유발된다. 이러한 합병증은 심근경색, 시력상실, 말기 신부전, 하지 절단 등의 심각한 결과를 초래하여 결과적으로 당뇨병 환자의 10년 내 사망률을 정상인 대비 2배 가량 증가시키는 것으로 알려져 있다.

당뇨병은 크게 1형 당뇨와 2형 당뇨의 두 가지 형태로 나누어 지는데,<sup>2</sup> 먼저 1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)으로서 전체 당뇨 환자의 5~10%를 차지하며 인슐린을 분비하는  $\beta$  cell의 파괴로 인해 인슐린을 분비하지 못함으로써 발생하는 당뇨병이다. 1형 당뇨는 자가면역질환의 일종으로 분류되며 주로 30세 이전에 발생하고 대부분의 환자들이 비만하지 않다는 특징을 가지고 있다. 2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병 (noninsulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)으로서 전체 당뇨 환자의 90~95%를 차지하며  $\beta$  cell의 기능 이상에 의한 인슐린 분비의 저하 또는 인슐린 저항성이 주요한 원인이다. 2형 당뇨는 주로 유전적인 요인에 환경적인 요인이 더해지면서 발생하는데 최근 노인 인구의 증가, 급속한 산업화에 따른 식생활의 변화, 신체 활동의 감소, 비만, 스트레스, 음주 및 흡연 등에 의해 그 발생률이 증가하고 있다.

세계 당뇨 연맹 (International Diabetes Federation)에 따르면 전세계 당뇨병 환자수는 2007년에 2억 4천만 명이었으며 매년 7백만 명의 환자가 추가로 발생하여 2025

년에는 3억 8천만 명으로 증가할 것이 예상되고 있다.<sup>3</sup> 또한 당뇨병 환자수가 전체 인구의 10% 수준인 400만 명 이상으로 추정되는 국내를 비롯하여 아시아계에서도 당뇨 유병률이 빠른 증가를 보이고 있다. 이처럼 당뇨병, 특히 2형 당뇨는 높은 유병률과 지속적인 환자수 증가로 인해 세계적으로 심각한 사회적 비용을 초래하는 문제로 대두되어 있다.

## 2. 신규 2형 당뇨 치료제의 필요성

인슐린이 전혀 분비되지 않는 1형 당뇨의 경우 인슐린 주사제의 사용이 필수적이지만 2형 당뇨의 경우 다양한 경구용 치료제가 개발되어 있다. 2형 당뇨병 진단 후 우선적으로는 운동 및 식이 요법이 권고되지만 이를 통한 치료에 실패할 경우 1차로 선택되는 약제는 biguanide 계의 metformin이며, 2차 및 3차 약제로 sulfonylurea 계, glinide 계, TZD 계, DPP-4 inhibitor 및 SGLT-2 inhibitor 등의 경구용 약물들이 사용되고 있다. 그리고 이들 약물에 의해서도 혈당이 조절되지 않을 경우 GLP-1 agonist 주사제 또는 insulin 주사제가 처방되는 것이 일반적이다. 그러나 다양한 기전의 많은 치료제가 개발되었음에도 불구하고 이들이 가진 한계 및 부작용에 의해 여전히 신규 약물에 대한 필요성이 존재하는데, 현재 사용되는 경구용 2형 당뇨 치료제의 문제점을 그 종류 및 특징과 함께 Table 1에 정리하였다.

2형 당뇨병은 인슐린 분비능 장애, 인슐린 저항성, 간에서의 당신생 증가 등 복합적인 기전에 의해 발생하므로 대부분의 환자에서 시간이 경과함에 따라 한가지 이상의 약물이 필요하다. 실제로 1차 치료제인 metformin과 sulfonylurea 계열 약물의 경우 5년 이상 장기간 사용시 효능이 약화되거나 상실되는 것으로 알려져 있으며 이 경우 기전이 다른 약제를 병용하여 치료하는 것이 보편적이다. 그러나 Table 1에서 보듯이 현재 사용되고 있는 대부분의 2형 당뇨 치료제들은 저혈당, 체중 증가, 부종, 심혈관계 위험, 위장장애, 감염 위험 증가 등 다양한 부작용을 가지고 있기 때문에 병용 요법에 대한 부담이 높으며, 따라서 보다 안전한 신규 약물에 대한 필요성이 지속적으로 제기되고 있다.

**Table 1.** Classification for the oral anti-diabetic agents

계열	주요 약물	특징	문제점
Biguanides	Metformin	간에서 당신생 억제, 장에서 당 흡수 억제, 체중 증가 및 저혈당 없음	위장장애 (설사, 복부경련), 유산증 위험, 신기능 저하, 장기 사용시 효능 상실
Sulfonylureas	Glyburide Glipizide Gliclazide Glimepiride	인슐린 분비 촉진	체중증가, 저혈당, 장기 사용시 효능 상실
Glinides	Repaglinide Nateglinide	인슐린 분비 촉진	체중증가, 저혈당, 위장장애, 효능 미흡
TZDs	Rosiglitazone Pioglitazone	인슐린 감수성 개선, 혈당 강하 효과 우수, 저혈당 없음	체중증가, 부종, 골절, 심혈관계 부작용 및 방광암 위험 등으로 일부 퇴출
$\alpha$ -Glucosidase inhibitors	Acarbose Voglibose	탄수화물 소화 및 흡수 억제, 식후 혈당 감소	위장장애 (설사, 복부팽만)
DPP-4 inhibitors	Sitagliptin Vildagliptin Saxagliptin Linagliptin	GLP-1 대사 억제, 인슐린 분비 촉진, 체중증가 및 저혈당 없음	효능 다소 미흡, 장기 안전성 우려 (혈관부종, 폐장염, 감염위험)
SGLT-2 inhibitors	Dapagliflozin Canagliflozin	신장에서 당의 재흡수 억제, 당의 뇨 배설 촉진	비뇨기계 감염 증가, 발암성 우려

최근 2형 당뇨병 및 대사증후군에 있어서 인슐린 저항성이 근본적인 원인인 것으로 밝혀지면서 인슐린 저항성을 개선할 수 있는 insulin sensitizer의 역할이 더욱

중요하게 평가되고 있다. 기존 2형 당뇨 치료제 중 insulin sensitizer는 복합적인 기전을 갖는 metformin을 제외하면 PPAR $\gamma$  agonist 인 TZD 계 약물이 유일했으나 최근 이 계열의 대표적 약물인 rosiglitazone과 pioglitazone이 각각 심장 부작용 및 방광암 위험 등의 안전성 이슈로 퇴출되고 있어 이를 대체할 안전한 insulin sensitizer의 개발 역시 절실한 상황이다.

한편, 2형 당뇨병은 대사증후군의 한 형태로서 비만을 동반하는 경우가 전체 환자의 47~85%, hyperlipidemia 및 hypertension을 동반하는 경우가 70~82%에 이르고 있으며, 당뇨 환자 사망 원인의 2/3가 심장 질환임이 보고되어 있다. 이를 고려할 때 당뇨병 환자의 경우 사망에 이를 수 있는 심혈관계 합병증을 적극적으로 예방 및 치료하는 것이 무엇보다도 중요하고, 따라서 혈당 강하 효능 외에 체중 감소, lipid profile 개선에 의한 심혈관 보호 등 대사질환 전반에 대한 추가적인 장점을 가진 신규 치료제의 필요성 역시 존재하고 있다.

### 3. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1

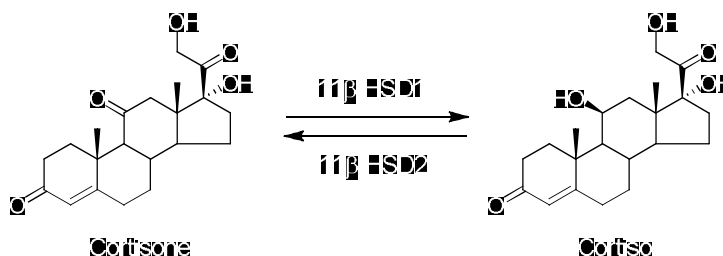
11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1)은 NADPH 의존적 환원 효소로서 glucocorticoid의 비활성형인 cortisone을 활성형인 cortisol로 전환하는데 핵심적인 효소이다. (Figure 1) 11 $\beta$ -HSD1은 간, 지방, 근육, 뇌 조직 등에 주로 분포하며 해당 조직에서 glucocorticoid의 활성을 조절하는 역할을 수행한다.<sup>4</sup>

활성형 glucocorticoid인 cortisol은 부신 피질에서 분비되는 스트레스 호르몬으로서 glucocorticoid receptor에 결합하여 인슐린 길항적인 대사 조절제로 작용하며 체내의 당 항상성 유지, 지질 및 단백질 대사에 있어서 중요한 역할을 한다. 그러나 만성적으로 간과 지방 조직 내의 cortisol 농도가 높을 경우 인슐린 저항성 증가, 간에서의 당신생 증가, 인슐린 의존적 당 흡수 감소, 인슐린 분비 감소, 지방분해 증가 등이 유도되어 혈당이 상승하게 되고 비만, 고혈압, 고지혈증 등이 야기된다. 이러한 cortisol과 대사질환 사이의 상관관계가 밝혀지면서 11 $\beta$ -HSD1을 억제하는 것이 2형 당뇨 및 대사증후군을 치료할 수 있는 유망한 전략으로서 주목 받게 되었다.<sup>5</sup>



이 전략은 genetic mouse model을 이용한 실험들에 의해 증명되었는데, 예를 들어 간 또는 지방조직에 11 $\beta$ -HSD1을 과 발현시킨 transgenic mouse의 경우 혈액에서의 cortisol 농도는 정상이지만 조직에서의 cortisol 농도가 증가되어 복부비만, 내장지방 증가, dyslipidemia, glucose intolerance, 인슐린 저항성 등을 포함한 대사증후군의 증상이 관찰되었다.<sup>6</sup> 반대로 11 $\beta$ -HSD1 knock-out mouse의 경우 고지방 식이 조건에서도 비만에 대한 저항성을 보여주었으며 인슐린 감수성 증가, 간에서의 당신생 감소, glucose uptake 증가, 혈중 LDL-cholesterol과 triglyceride의 감소 및 HDL-cholesterol의 증가, 체중 및 복부 지방의 감소 등 대사증후군 전반에 대한 개선 효능을 나타냄이 보고되었다.<sup>7</sup>

한편, 11 $\beta$ -HSD1의 isoform인 11 $\beta$ -HSD2는 NAD 의존적으로 11 $\beta$ -HSD1의 반대 작용, 즉 cortisol의 cortisone으로의 전환을 매개한다. 11 $\beta$ -HSD2는 신장, 소화관, 태반 등에 발현되어 있으며 cortisol을 비활성형으로 전환하여 이들 조직이 가지고 있는 mineralocorticoid receptor를 보호하는 역할을 수행하는데, 따라서 11 $\beta$ -HSD2가 억제될 경우 sodium retention, hypokalemia, hypertension 등이 유발되는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup> 실제로 비선택적 11 $\beta$ -HSD1 억제제인 carbenoxolone은 비만이 아닌 건강한 지원자 및 2형 당뇨 환자를 대상으로 한 임상시험에서 인슐린 감수성을 개선하였으나 11 $\beta$ -HSD2 억제로 인한 부작용이 보고되어 개발이 중단된 바 있다.<sup>9</sup>



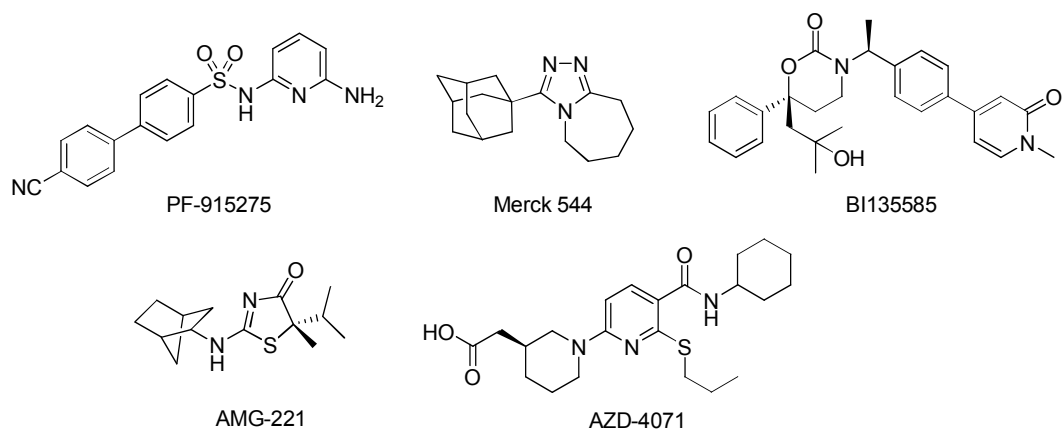
**Figure 1.** Interconversion of cortisone and cortisol by 11 $\beta$ -HSD enzymes

#### 4. 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor 개발 동향

11 $\beta$ -HSD1에 대한 효과적이고 선택적인 inhibitor는 glucocorticoid의 활성형으로의 변환을 저해함으로써 간과 지방 등 타겟 조직에서 glucocorticoid의 작용을 억제하고, 그 결과 glucocorticoid에 의해 야기되는 2형 당뇨 및 대사증후군에 대한 치료제로 사용될 수 있을 것으로 예상된다. 앞에서 설명했듯이 2형 당뇨 및 대사증후군의 근본적인 원인으로 인슐린 저항성이 주목 받고 있으나 최근 개발된 대부분의 당뇨병 신약들 (DPP-4 inhibitor, SGLT-2 inhibitor)은 인슐린 분비를 촉진하거나 당의 배설을 유도하는 기전을 가지고 있다. 반면 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor는 새로운 insulin sensitizer로서 타 기전의 약물과 병용할 경우 인슐린 분비 및 저항성 문제를 동시에 해결하여 병용의 시너지를 극대화할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 체중 감소 및 lipid profile 개선에 의한 심혈관 보호 등 추가적인 효능을 보유할 가능성이 높아 당뇨병 환자의 심혈관계 합병증을 예방하고 비만, hyperlipidemia, hypertension 등 대사질환 전반으로의 적응증 확대 역시 가능할 것으로 기대되고 있다.

이러한 장점에 주목하여 지난 십 수년간 다국적 제약회사들을 중심으로 다양한 화학구조를 갖는 선택적 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor들이 연구 개발되었으며,<sup>10</sup> 대표적으로 PF-915275<sup>11</sup> 등의 sulfonamide 구조, Merck 544<sup>12</sup> 등의 triazole 구조, BI135585<sup>13</sup> 등의 oxazinanone 구조, AMG-221<sup>14</sup> 등의 thiazolone 구조, AZD-4071<sup>15</sup> 등의 carboxamide 구조 화합물이 보고되었다. (Figure 2) 이 중 일부 화합물들은 임상시험 단계에 진입한 바 있는데 Incyte 사의 INCB-13739 (구조 미공개)의 경우 임상 2상 시험에서 비만한 2형 당뇨 환자를 대상으로 4주간 투여한 결과 유의적인 인슐린 감수성 개선, LDL 및 total cholesterol 감소가 확인되었으며, metformin 단독 요법에 실패한 2형 당뇨 환자를 대상으로 12주간 투여한 결과 당화혈색소 (-0.6%), 공복 혈당 (-24 mg/dl), total cholesterol 및 체중의 유의적인 감소가 확인되어 혈당 강하 외에 대사질환 전반에 대한 개선 효능이 동반되는 본 기전의 장점이 증명되었다.<sup>16</sup> Pfizer 사의 PF-915275, Amgen 사의 AMG-221, Astrazeneca 사의 AZD-4071 역시 임상 1상 시험을 진행한 바 있고, Merck사의 MK-0916 및 MK-0736, Roche 사의 RG-4929, Eli Lilly 사의 LY-2523199, Bristol-Myers Squibb 사의 BMS-816336 등의 경우 2형 당뇨, 대사증후군, dyslipidemia, hypertension 등을 적응증으로 임상 2상 시험까지 진행한 바 있으며, 현

제 Boehringer Ingelheim 사의 BI135585가 비만을 동반한 2형 당뇨 환자를 대상으로 임상 2상 시험을 진행 중에 있다.



**Figure 2.** Chemical structures of the previously reported 11β-HSD1 inhibitors

## 5. 연구 배경 및 목적

이와 같이 다양한 화학구조의 11β-HSD1 inhibitor들이 연구되어 왔으나 이 중 다수의 화합물들이 임상시험 과정에서 개발 중단되었다. PF-915275의 경우 임상 2상 시험 중 제제학적인 이유로 개발을 중단하였고<sup>17</sup> MK-0916 및 MK-0736의 경우 12주간 투여한 임상 2상 시험 결과 불충분한 효능으로 endpoint를 충족하지 못하였음을 보고한 바 있으나<sup>18</sup> 임상 시험 중 개발이 중단된 나머지 11β-HSD1 inhibitor들의 경우 그 중단 사유가 명확하게 알려져 있지 않다.

기존 11β-HSD1 inhibitor들의 한계와 실패에 대해 다양한 가능성이 제기되고 있는데,<sup>19</sup> 첫째는 타겟 조직에서의 효능이 불충분했을 것이라는 분석이다. 2형 당뇨 및 비만 등 대사질환의 진행 과정에서 11β-HSD1은 간과 지방 조직 모두에서 과다하게 활성화되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 충분한 치료 효능을 위해서는 투여된 11β-HSD1 inhibitor가 간과 지방 조직 모두에 적절하게 분포되어 두 조직 모두에서 지속적인 11β-HSD1 억제 활성을 나타내는 것이 필수적일 것으로 판단된다.

기존 화합물들 중 일부는 타깃 조직으로의 분포가 불균형적이거나 작용 시간의 지속성이 부족하여 임상적 효능이 미흡했을 것으로 생각되고 있다.

둘째는 설치류 11 $\beta$ -HSD1에 대한 종차로 인해 질환 동물모델에서의 평가가 제한적으로 수행되고 따라서 최적의 임상 후보물질을 선정하는데 실패했을 가능성이 있다. 실제로 다수의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor들에서 human 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성 대비 mouse 또는 rat 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성이 크게 떨어지는 경우가 보고되어 있는데,<sup>20</sup> 이 경우 후보 화합물들의 PK-PD relationship을 분석하는 것이 용이하지 않게 된다. 뿐만 아니라 설치류를 사용하여 확립되어 있는 다양한 질환모델의 활용도 제한적이어서 결과적으로 in-vivo efficacy 측면에서 가장 우수한 후보물질을 선정하는데 실패하게 될 확률이 높다.

마지막으로 PXR activation 가능성이다. PXR은 외인성 물질에 반응하여 대사에 관련된 유전자를 활성화시키는 nuclear receptor로서 약물에 의해 활성화 될 경우 CYP3A4, multidrug resistance protein 등의 대사 효소가 유도되어 약물의 clearance를 증가시키고 약물 상호작용의 문제를 발생시킨다.<sup>21</sup> PXR과 11 $\beta$ -HSD1은 모두 ligand와의 interaction site가 강한 hydrophobicity를 띄고 있는 것으로 알려져 있어 활성이 강한 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor의 경우 PXR에 대한 활성화 가능성 역시 높을 것으로 판단된다.<sup>22</sup> 실제로 임상 시험에 진입했던 AMG-221과 MK-0916의 경우 PXR activation 문제가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 MK-0916는 임상 2상 시험에서 CYP3A4 유도에 의한 것으로 추정되는 LDL-cholesterol의 증가가 예측하지 못한 결과로서 보고되기도 하였다.<sup>18</sup>

본 연구에서 저자는 2형 당뇨 및 대사증후군에 대한 새로운 치료제를 개발할 목적으로 신규의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor를 도출하고자 하였다. 앞에서 분석한 기존 화합물의 한계를 극복하기 위해 human 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성이 우수한 화합물에 대해서는 mouse 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성을 확인하여 mouse pharmacodynamic (PD) model을 이용한 효능 평가를 초기 단계부터 수행하기로 계획하였다. PD 효능은 간과 지방 조직 모두에서 우수하고 1일 1회 투여가 가능한 수준의 지속성을 갖는 것을 목표로 하였으며, 이를 기반으로 mouse를 이용한 질환 동물모델에서 혈당

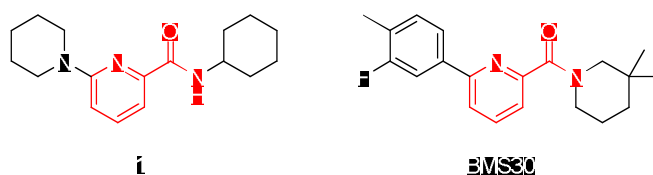
및 인슐린 감소, lipid profile 개선 등 다양한 in-vivo efficacy를 확인하여 임상 시험에서 유효성이 확인될 가능성을 극대화 하고자 하였다.

또 다른 한편으로 신규의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor는 화학구조적으로 기존의 화합물과 차별화되고 lipophilicity를 최대한 감소시키는 것을 목표로 하였다. 11 $\beta$ -HSD1의 substrate interaction site의 hydrophobicity가 크다는 점과 본 기전 약물의 경우 타깃 조직으로의 분포가 중요하다는 점을 고려할 때 이는 매우 어려운 작업으로 예상되었지만, 기존 화합물의 PXR activation 문제 극복, 대사안정성의 개선, CYP 및 hERG inhibition 회피 등 우수한 drug-likeness를 확보한다는 측면에서 적절한 polarity을 갖는 화합물의 도출은 중요한 문제로 판단되었다.

## II. 유효물질 최적화 연구

### 1. 연구 방향성

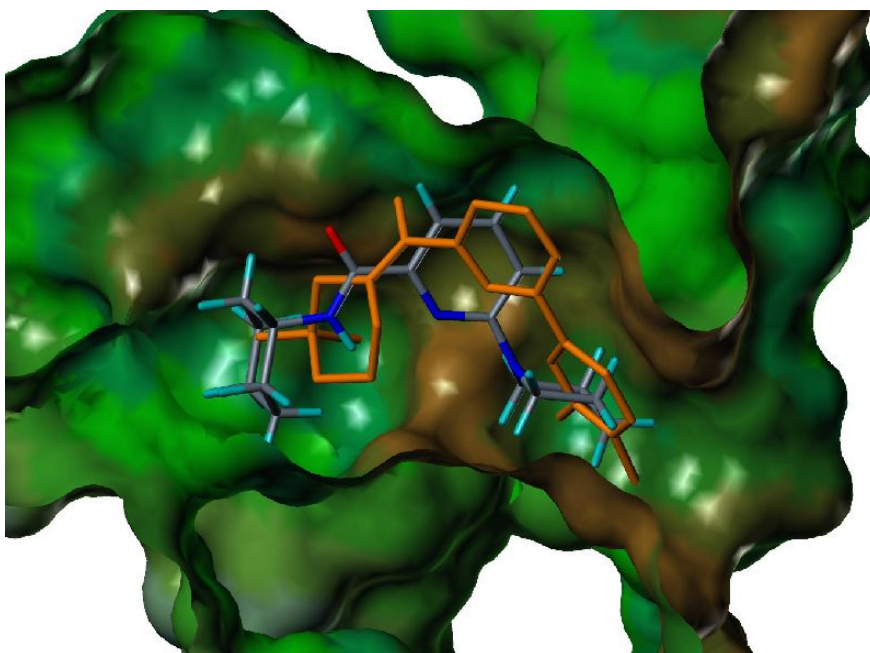
우수한 활성을 가진 신규의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor를 도출하기 위해 먼저 11 $\beta$ -HSD1 enzyme을 이용한 assay 방법을 확립하고 3500여 종의 library 화합물에 대한 high throughput screening을 수행하여 유효물질 (hit compound) **1**을 신규 구조의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor로서 확인하였다. 흥미롭게도 화합물 **1**은 기존에 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor로 문헌에 보고된 Bristol-Myers Squibb 사의 BMS30<sup>23</sup>과 동일한 picolinamide 구조를 core structure로 공유하고 있었다. (Figure 3) 또한 BMS30의 경우 human 11 $\beta$ -HSD1 enzyme과의 co-crystal structure가 보고되어 있었으며 (PDB code 3CH6), 따라서 11 $\beta$ -HSD1과 BMS30의 co-crystal structure에 유효물질 **1**을 Surflex-Dock을 이용하여 docking 해 볼 수 있었다. 그 결과 11 $\beta$ -HSD1의 binding site에 대해 BMS30과 화합물 **1**은 전체적으로 유사한 binding mode를 가지고 있음이 확인되었다. (Figure 4)



**Figure 3.** Chemical structures of hit compound **1** and BMS30

BMS30의 carbonyl group과 달리 화합물 **1**의 carbonyl group은 11 $\beta$ -HSD1의 key interaction residue인 Ser170과 Tyr183의 hydroxyl group과의 hydrogen bonding이 다소 약한 것으로 측정되었으나, 대신 secondary amide 형태로 연결된 cyclohexane ring이 11 $\beta$ -HSD1의 hydrophobic binding pocket에 더욱 가깝게 위치하여 강한 hydrophobic interaction을 하는 것으로 나타났다. 한편, 화합물 **1**의 piperidine ring은 11 $\beta$ -HSD1 enzyme의 dimer interface region의 solvent-exposed area를 향해 위치하면서 주변부와

의 hydrophobic interaction 역시 가지는 것으로 분석되었다. 이상의 화합물 **1**과 11 $\beta$ -HSD1 사이의 binding mode 및 interaction에 대한 분석은 이후 화합물 **1**의 최적화를 위한 medicinal chemistry 연구를 수행함에 있어 많은 정보를 제공하였다.



**Figure 4.** Overlap of BMS30 (in brown stick) and compound **1** in the binding site of human 11 $\beta$ -HSD1. The protein structure and pose of BMS30 were taken from 3CH6. Predicted binding mode of **1** was generated by Surflex-Dock.

유효물질 **1**은 human 11 $\beta$ -HSD1에 대해 비교적 우수한 억제 활성 ( $IC_{50} = 58$  nM)을 나타냈지만 mouse liver microsome을 이용한 대사안정성 시험에서 매우 낮은 대사안정성 (30분 후 잔류량 15%)을 보여주었다. 유효물질 최적화 연구에서는 화합물 **1**의 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성 및 대사안정성을 동시에 개선하여 선도물질 (lead compound) 수준의 화합물을 도출하고자 하였다. 이를 위해 화합물 **1**의 cyclohexane ring과 piperidine ring을 변형하기로 계획하였는데, 이는 이들 ring의 lipophilicity가

11 $\beta$ -HSD1과의 hydrophobic interaction에 있어 중요한 역할을 수행함에도 불구하고 대사적으로 매우 불안정한 부위로 예측되었기 때문이다.

## 2. 신규 화합물의 합성

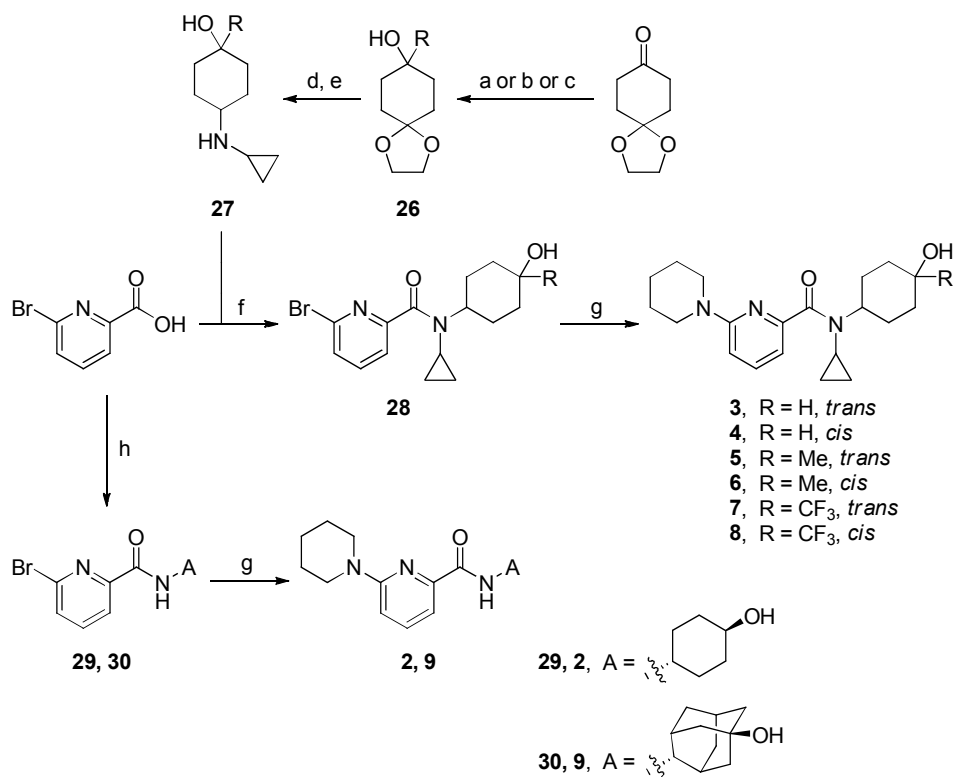
유효물질 **1**의 대사안정성을 개선하기 위하여 먼저 cyclohexane ring의 4번 위치에 polar functional group인 hydroxyl group을 도입한 신규 유도체를 합성하였다. 또한 hydroxyl group의 도입으로 야기될 지 모르는 hydrophobic interaction의 감소를 보완하기 위하여 amide group에 cyclopropyl group을 추가로 도입하거나 cyclohexane ring의 4번 위치에 Me, CF<sub>3</sub> 등 작은 hydrophobic group을 함께 도입한 유도체도 합성하였으며, cyclohexane ring을 adamantane ring으로 전환한 신규 유도체 역시 합성하였다. 이들 유도체를 합성함에 있어 structure-activity relationship의 분석을 고려하여 유효물질 **1**의 나머지 구조는 그대로 유지하였다.

Cyclohexane ring이 변형된 유도체 **2-9**는 Scheme 1에 제시된 방법에 따라 합성되었다. 먼저 1,4-cyclohexanedione mono-ethylene ketal을 MeOH 용매 하에서 NaBH<sub>4</sub>로 reduction 하거나 THF 용매 하에서 MeMgCl 또는 TMSCF<sub>3</sub>로 처리하여<sup>24</sup> 8번 위치에 H, Me, CF<sub>3</sub>가 각각 도입된 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol **26**을 합성하였다. 각각의 화합물 **26**을 1N-HCl로 처리하여 탈 보호한 후, 얻어진 4-substituted cyclohexanone에 cyclopropylamine과 NaBH(OAc)<sub>3</sub>을 사용한 reductive amination 반응을 수행하여 3종의 4-substituted *N*-cyclopropylcyclohexanamine **27**을 수득하였다. 이들 화합물 **27**에 대해 각각 6-bromopicolinic acid와 HBTU를 이용한 coupling 반응을 진행하였으며 silica gel column chromatography를 통하여 *cis* 및 *trans* 중간체 **28**을 각각 분리하였다.<sup>25</sup> 마지막으로 각각의 중간체 **28**에 대해 piperidine과 microwave irradiation 반응을 진행하여 신규의 6-(piperidin-1-yl)picolinamide 유도체 **3-8**을 합성하였다.

Cyclopropyl ring이 도입되지 않은 화합물 **2**와 **9** 역시 유사한 방법으로 합성되었다. 먼저 6-bromopicolinic acid와 상업적으로 이용 가능한 *trans*-4-aminocyclohexanol 또는 *trans*-4-aminoadamantan-1-ol을 HBTU-coupling 하여 중간체 **29**와 **30**을 수득한



후 각각 piperidine과 microwave irradiation 반응을 수행하여 신규의 6-(piperidin-1-yl)picolinamide 화합물 **2**와 **9**를 합성하였다.



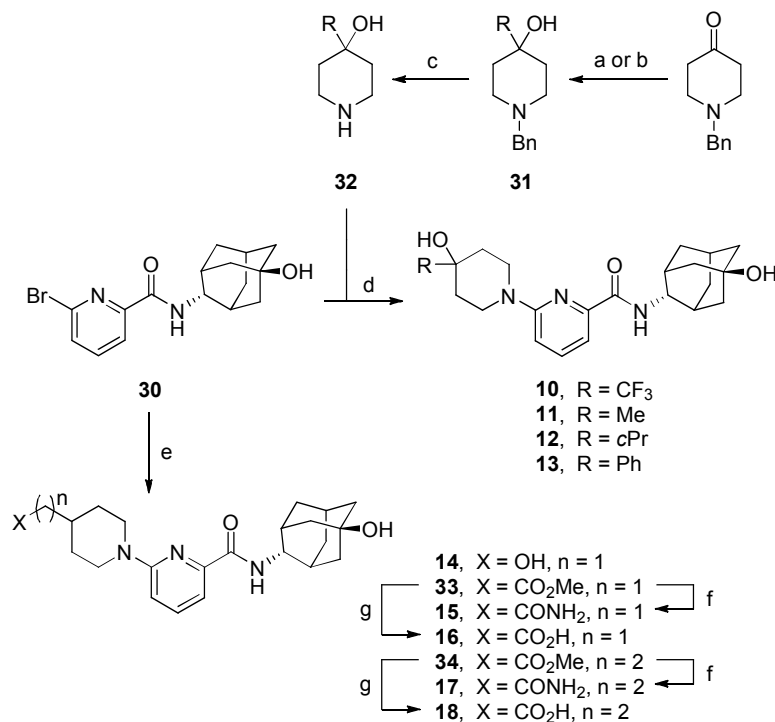
**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 98%, (R = H); (b) MeMgCl, THF, 59% (R = Me); (c) TMSCF<sub>3</sub>, TBAF, THF, 97% (R = CF<sub>3</sub>); (d) 1N-HCl, THF, 62-92%; (e) cyclopropylamine, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, DCE, 87-95%; (f) HBTU, DIPEA, ACN, 65-90%; (g) piperidine, ACN, 150°C, microwave, 82-99%; (h) *trans*-4-aminocyclohexanol or *trans*-4-aminoadamantan-1-ol, HBTU, DIPEA, ACN, 73-85%.

다음으로 piperidine ring의 4번 위치에도 polar functional group인 hydroxyl group을 도입하여 대사안정성의 개선 여부를 확인하고자 하였다. Cyclohexane ring의 변형에서와 마찬가지로 hydroxyl group의 도입에 의한 hydrophobic interaction의 감소가

능성을 방지하기 위하여 piperidine ring의 4번 위치에 CF<sub>3</sub>, Me, cyclopropyl, phenyl 등 hydrophobic group을 동시에 도입한 유도체를 설계하여 합성하였다. 또한 유효물질 **1**의 11β-HSD1에 대한 docking 연구에서 piperidine ring이 solvent-exposed area를 향해 위치했음을 고려하여 piperidine ring에 적절한 길이의 carbon chain을 매개로 alcohol, amide, carboxylic acid 등의 hydrophilic group을 도입한 신규 유도체 역시 합성하였다. 이들 유도체의 경우 화합물의 오른쪽 부분을 hydroxy-adamantyl ring으로 고정하고 합성하였다.

Piperidine ring이 변형된 유도체 **10-18**은 Scheme 2에 제시된 방법에 따라 합성되었다. 출발물질 1-benzylpiperidin-4-one을 THF 용매 하에서 TMSCF<sub>3</sub> 또는 적절한 alkyl magnesium halide와 반응시켜 4번 위치에 CF<sub>3</sub>, Me, cyclopropyl, phenyl group이 각각 도입된 1-benzylpiperidin-4-ol **31**을 합성한 후, palladium 촉매 및 수소기류 하에서 탈 보호하여 4-substituted piperidin-4-ol **32**를 각각 수득하였다. piperidin-4-ol **32**를 합성된 중간체 **30**과 microwave irradiation을 통해 반응시켜 6번 위치가 다양한 형태의 piperidine으로 치환된 신규의 *N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide 유도체 **10-13**을 합성하였다.

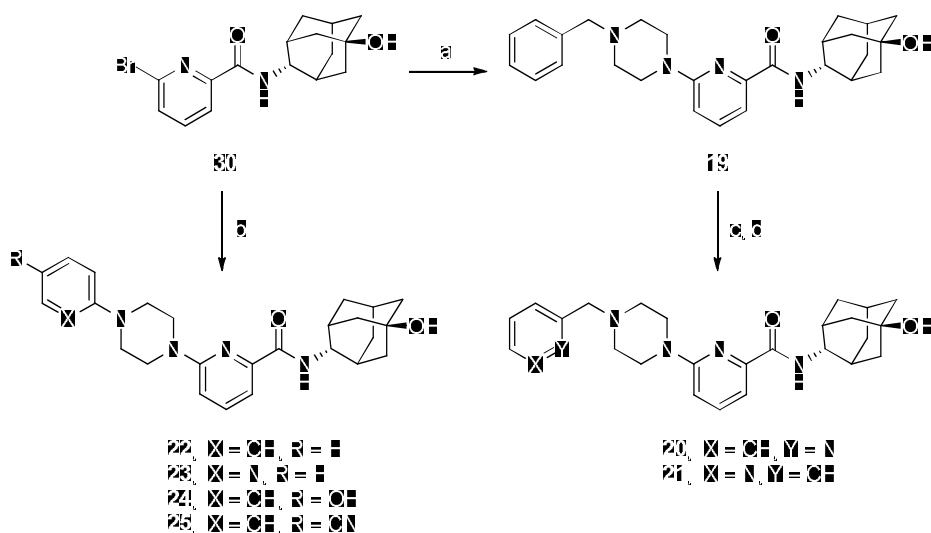
유도체 **14**의 경우 중간체 **30**과 piperidin-4-ylmethanol을 microwave irradiation 반응하여 간단히 수득하였고, 유도체 **15-18**의 경우 중간체 **30**과 methyl 2-(piperidin-4-yl)acetate 또는 methyl 3-(piperidin-4-yl)propanoate를 microwave irradiation 반응하여 ester 중간체 **33**과 **34**를 수득한 후 각각을 formamide 및 NaOMe 처리하여 amide로 전환하거나<sup>26</sup> 가수분해하여 carboxylic acid로 전환함으로써 합성하였다.



**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a) TMSCF<sub>3</sub>, TBAF, THF, 89% (R = CF<sub>3</sub>); (b) RMgX, THF, 30-73% (R = Me, <sup>c</sup>Pr, Ph); (c) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH, 28-98%; (d) TEA, ACN, 150 °C, microwave, 21-79%; (e) piperidin-4-ylmethanol or methyl 2-(piperidin-4-yl)acetate or methyl 3-(piperidin-4-yl)propanoate, TEA, ACN, 150 °C, microwave, 69-94%; (f) formamide, NaOMe, DMF, 100 °C, 64-79%; (g) 10% NaOH, MeOH, 62-78%.

마지막으로 piperidine ring을 phenylpiperazine 또는 benzylpiperazine으로 변형한 유도체를 설계하여 합성하였다. 또한 benzene ring을 pyridine ring으로 변형하거나 benzene ring에 hydroxyl group 또는 cyano group 등 polar functional group을 도입한 유도체 역시 합성하였는데, 이는 화합물의 cLogP가 감소되어 대사안정성이 개선되거나 11β-HSD1의 binding site와 추가적인 hydrogen bonding이 유도되어 활성이 개선되는지를 확인하기 위함이었다. 이들 신규 유도체 역시 화합물의 오른쪽 부분을 hydroxy-adamantyl ring으로 고정하고 합성하였다.

Piperazine ring이 도입된 유도체 **19-25**는 Scheme 3에 제시된 방법에 따라 합성되었다. 중간체 **30**에 palladium 촉매를 사용한 amination 반응을 수행하여 benzyl-piperazine이 도입된 유도체 **19**를 합성하였고, 화합물 **19**를 palladium 촉매 및 수소기류 하에서 탈 보호한 후 2종의 (bromomethyl)pyridine과 *N*-alkylation 반응을 수행하여 유도체 **20**과 **21**을 각각 수득하였다. 또한 중간체 **30**과 4종의 1-arylpiperazine에 대해 각각 microwave irradiation 반응을 수행하여 신규 유도체 **22-25**를 합성하였다.



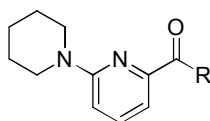
**Scheme 3.** Reagents and conditions: (a) 1-benzylpiperazine,  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , xantphos,  $\text{NaO}^t\text{Bu}$ , toluene,  $100^\circ\text{C}$ , 34%; (b) 1-arylpiperazine, TEA, ACN,  $150^\circ\text{C}$ , microwave, 64-84%; (c)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, 95%; (d) (bromomethyl)pyridine hydrobromide, DIPEA, DCE,  $70^\circ\text{C}$ , 60-72%.

### 3. 활성 검색 및 구조-활성 관계 연구

합성된 화합물의 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성은 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay 및 cell-based assay를 사용하여 평가되었다. 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay는 11 $\beta$ -HSD1이 과 발현된 cell의 microsomal fraction을 enzyme source로, NADPH를 cofactor로 사용하여 수행하였다. 11 $\beta$ -HSD1 cellular assay는 11 $\beta$ -HSD1의 cDNA를 안정적으로 transfection한 HEK293 cell을 NADPH의 추가적인 공급 없이 사용하여 수행하였다. Enzyme assay 및 cellular assay 모두 11 $\beta$ -HSD1의 활성은 cortisone이 cortisol로 전환되는 정도를 측정함으로써 평가되었는데, 이때 cortisol의 양은 enzyme immunoassay (EIA) 법을 사용하여 정량 하였다. 추가적으로 각각의 화합물을 mouse liver microsome과 함께 30 분 동안 incubation 한 후 잔류량을 측정하여 대사안정성을 평가하였다.

먼저 cyclohexane ring이 변형된 유도체 **2-9**에 대한 활성 및 대사안정성 검색 결과를 Table 2에 나타내었다. 앞에서 설명한 바와 같이 유효물질 **1**의 대사안정성을 개선하기 위하여 가장 먼저 시도한 최적화 연구는 cyclohexane ring의 4번 위치에 hydroxyl group을 도입하는 것이었는데, 11 $\beta$ -HSD1과의 hydrophobic interaction 감소로 인해 활성이 감소할 수 있다는 예상과 달리 4-hydroxycyclohexyl 화합물 **2**는 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay에서 화합물 **1** 대비 2배 정도 증가한 억제 활성을 나타내었다. 이는 cyclohexane ring이 interaction하는 11 $\beta$ -HSD1의 hydrophobic binding pocket에 hydroxyl group과의 hydrogen bonding이 가능한 amino acid chain이 존재하기 때문으로 추정된다.

한편, 11 $\beta$ -HSD1 enzyme과의 hydrophobic interaction을 증가시키기 위하여 화합물 **2**의 amide group에 cyclopropyl group을 도입한 화합물들 (**3-4**)과 cyclohexane ring의 4번 위치에 작은 alkyl group까지 추가로 도입한 화합물들 (**5-8**)의 경우 화합물 **1** 또는 **2**와 비교할 때 enzyme assay에서의 활성이 상당히 개선되는 것을 보여주었다. 이 결과는 화합물의 오른쪽 부분의 lipophilicity를 증가시키는 것이 hydrophobic interaction의 증가를 통해 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성을 개선해 줄 것이라는 가설을 증명해주었다.

**Table 2.** *In vitro* data of the cyclohexyl ring modified derivatives

Compd	R	hHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	HEK293 <sup>a</sup> (%Inh. @ 100nM)	MLM MST <sup>b</sup> (%R <sub>30min</sub> )
1		58	ND <sup>c</sup>	15
2		27	14	22
3		21	17	23
4		1.8	70	26
5		6.4	22	27
6		4.6	39	39
7		3.7	26	17
8		13	19	9
9		1.7	99	69

<sup>a</sup> HEK293 cells stably transfected with human 11 $\beta$ -HSD1 cDNA<sup>b</sup> Metabolic stability test using mouse liver microsomes<sup>c</sup> Not determined

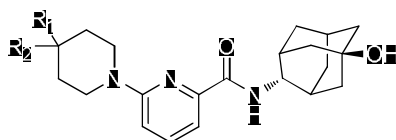
그러나 화합물 **2-8**은 모두 대사안정성에 있어서 뚜렷한 개선을 나타내지 못했고 (mouse liver microsome에서 30분 후 잔류량 40% 이하), 화합물 **4**를 제외하고는 cell-based assay에서의 활성 역시 낮게 측정되었다. (100 nM 농도에서의 억제율 40% 이하) 흥미롭게도 화합물 **2**의 hydroxy-cyclohexyl ring 위치에 hydroxy-adamantyl ring을 도입한 화합물 **9**의 경우 lipophilicity의 증가를 통해 화합물 **2** 대비 16배의 enzymatic potency 증가를 나타냈으며, 화합물 **2**와 비교할 때 다소 높은 cLogP 값에도 불구하고 상당히 개선된 대사안정성 역시 나타내었다. (mouse liver microsome에서 30분 후 잔류량 69%) 또한 화합물 **9**는 enzyme assay 뿐 아니라 cellular assay에서도 매우 우수한 활성을 보여주었다. (100 nM 농도에서의 억제율 99%)

다음으로 piperidine ring에 치환기가 도입된 유도체 **10-18**에 대한 활성 및 대사안정성 검색 결과를 Table 3에 나타내었다. piperidine ring이 변형된 유도체들의 경우 화합물 **9**의 우수한 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성과 개선된 대사안정성에 근거하여 화합물의 오른쪽 부분을 hydroxy-adamantyl ring으로 유지하고 합성하였다. 또한 유효물질 **1**의 docking 연구에서 piperidine ring이 solvent-exposed area를 향해 위치했었기 때문에 piperidine ring의 4번 위치에 polar functional group을 도입하여도 활성에는 영향을 미치지 않으면서 대사에 취약한 위치를 막거나 화합물 전체의 cLogP 값을 낮춤으로써 대사안정성을 개선할 수 있을 것으로 생각되었다.

예상대로 piperidine ring에 hydroxyl group과 hydrophobic substituent를 함께 도입한 화합물들 (**10-13**) 및 적절한 길이의 carbon chain을 매개로 hydroxyl group 또는 amide group을 도입한 화합물들 (**14-15, 17**)은 화합물 **9**와 비교할 때 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성에 있어 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 대사안정성이 개선될 것이라는 예상과 달리 이 화합물들은 대부분 화합물 **9** 대비 상당히 낮은 대사안정성을 나타내었다. 반대로 carboxylic acid group을 도입한 화합물들 (**16, 18**)의 경우 enzyme assay에서의 활성이 다소 감소했지만 화합물 **9** 대비 개선된 대사안정성을 보여주었다. 그러나 이 화합물들은 cell-based assay에서의 활성이 매우 낮다는 한계를 가지고 있었는데 (100 nM 농도에서의 억제율 25% 이하) 이는 carboxylic acid group의 도입으로 인한

polarity의 증가가 화합물의 cell permeability를 상당히 감소시켰기 때문으로 추정된다.

**Table 3.** *In vitro* data of the substituted piperidine derivatives



Compd	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	hHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	HEK293 <sup>a</sup> (%Inh. @ 100nM)	MLM MST <sup>b</sup> (%R <sub>30min</sub> )
9	H	H	1.7	99	69
10	OH	CF <sub>3</sub>	2.7	97	8
11	OH	Me	3.9	90	46
12	OH	<sup>t</sup> Pr	3.2	98	3
13	OH	Ph	3.2	96	0
14	CH <sub>2</sub> OH	H	1.9	97	29
15	CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	H	6.6	28	47
16	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	H	18	12	71
17	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	H	4.1	83	63
18	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	H	8.7	25	82

<sup>a</sup> HEK293 cells stably transfected with human 11β-HSD1 cDNA

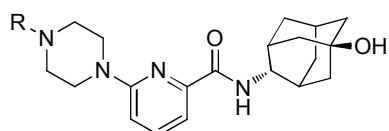
<sup>b</sup> Metabolic stability test using mouse liver microsomes



마지막으로 piperidine ring을 치환된 piperazine ring으로 변형한 유도체 **19-25**에 대한 활성 및 대사안정성 검색 결과를 Table 4에 나타내었다. 화합물 **9**의 piperidine ring을 *N*-benzyl-piperazine (**19**), *N*-pyridylmethylpiperazine (**20-21**), *N*-aryl-piperazine (**22-23**) 등으로 전환한 화합물들은 모두 화합물 **9** 대비하여 enzyme assay에서의 활성이 다소 감소하는 것으로 나타났다. 더욱이 이 화합물들은 모두 cellular assay에서의 활성 및 대사안정성에 있어서도 개선되는 모습을 보여주지 못했다.

전반적으로 *N*-benzyl-piperazine 형태의 화합물들 보다 *N*-phenyl-piperazine 형태의 화합물들이 더욱 우수한 활성 및 대사안정성을 나타내는 것으로 판단되어, *N*-phenyl-piperazine 화합물 **22**의 phenyl ring의 4번 위치에 polar functional group을 도입한 유도체 2종 (**24-25**)을 추가로 합성하여 검색하였다. 4-hydroxy-phenyl 화합물 **24**는 enzyme assay에서의 활성과 대사안정성이 화합물 **22** 대비하여 다소 개선되었으나 cellular assay에서의 활성은 상당히 감소하는 것으로 나타났다. 한편, 4-cyano-phenyl 화합물 **25**는 화합물 **22**와 비교할 때 enzyme assay 및 cell-based assay 모두에서 개선된 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성을 보여주었으며, 화합물 **22**뿐 아니라 화합물 **9**와 비교해서도 상당히 개선된 대사안정성을 나타내었다. (mouse liver microsome에서 30 분 후 잔류량 88%)

**Table 4.** *In vitro* data of the *N*-substituted piperazine derivatives



Comp	R	hHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	HEK293 <sup>a</sup> (%Inh. @ 100nM)	MLM MST <sup>b</sup> (%R <sub>30min</sub> )
19		6.8	91	21
20		9.5	87	39
21		7.2	89	60
22		3.8	97	44
23		3.7	96	45
24		3.1	7	74
25		2.8	99	88

<sup>a</sup> HEK293 cells stably transfected with human 11 $\beta$ -HSD1 cDNA

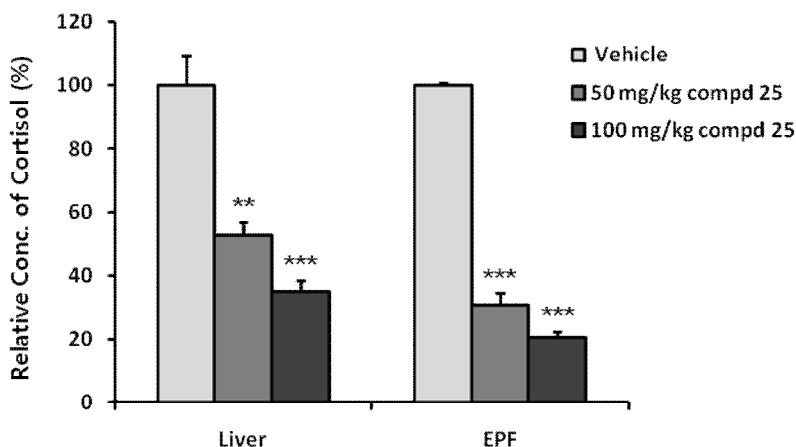
<sup>b</sup> Metabolic stability test using mouse liver microsomes

#### 4. PD 및 질환모델 시험

유효물질 최적화 연구 과정에서 합성 및 검색된 화합물 중 in-vitro potency와 대사안정성을 종합적으로 고려했을 때 가장 우수한 화합물은 화합물 **25**로 판단되었다. 화합물 **25**는 human 11 $\beta$ -HSD1에 대한 강력한 억제 활성 (human 11 $\beta$ -HSD1 IC<sub>50</sub> = 2.8 nM, HEK293 IC<sub>50</sub> = 6.7 nM) 및 개선된 대사안정성을 보유하였으며, mouse 11 $\beta$ -HSD1에 대한 enzyme assay에서도 충분한 억제 활성 (mouse 11 $\beta$ -HSD1 IC<sub>50</sub> = 4.3 nM)을 보여주었다. 따라서 화합물 **25**에 대해 mouse ex-vivo pharmacodynamic (PD) model<sup>27</sup>에서 추가적인 효능 평가를 진행해 보기로 하였다.

PD 효능의 측정을 위해 male C57BL/6 mouse에 화합물 **25**를 50 mg/kg 또는 100 mg/kg 용량으로 경구투여하고 투여 2시간 후 mouse의 liver와 epididymal fat (EPF)을 채취하였다. 채취한 liver 및 EPF 조직을 각각 cortisone을 포함한 tissue culture media에 넣고 cortisone이 cortisol로 전환되는 정도를 EIA kit를 사용하여 측정함으로써 liver 또는 EPF에 존재하는 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성을 평가하였다.

Figure 5에서 보듯이 화합물 **25**를 투여한 mouse의 liver와 EPF 조직에서 11 $\beta$ -HSD1의 활성은 용량의존적이고 유의적으로 감소되었다. Vehicle 투여 군과 비교할 때 화합물 **25**를 100 mg/kg 용량으로 투여한 군의 11 $\beta$ -HSD1 활성은 투여 2시간 후 liver와 EPF 조직에서 각각 65%, 80% 억제되어 있었다. 이는 경구 투여된 화합물 **25**가 효과적으로 흡수되고 liver와 fat 등의 타겟 조직으로 분포하여 조직 내에 존재하는 11 $\beta$ -HSD1에 대해 억제 활성을 발현할 수 있음을 보여주는 것이었다.

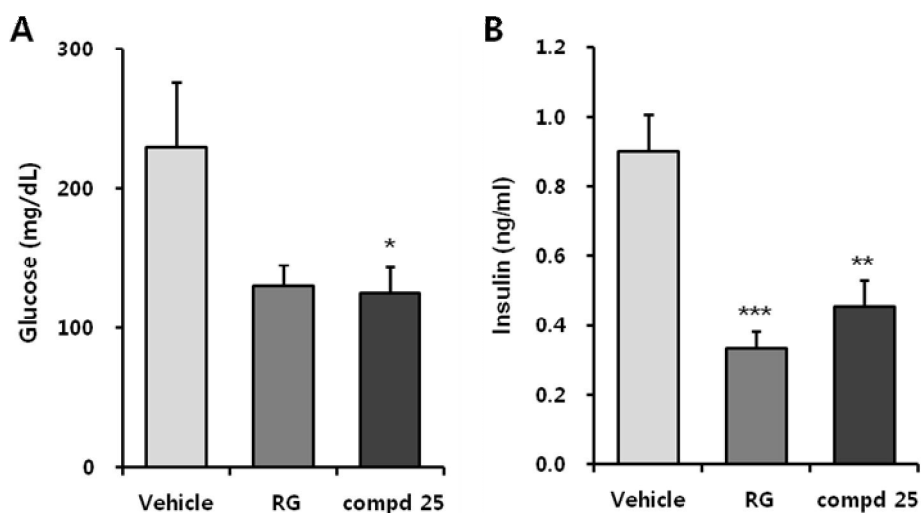


**Figure 5.** *Ex vivo* pharmacodynamic data for compound **25**. Acute effects of **25** were assessed by *ex vivo* cortisone to cortisol turnover in liver and epididymal fat (EPF). The compound was orally administered at 50 mg/kg or 100 mg/kg to lean C57BL/6 mice. Sterile water containing 0.5% methylcellulose and 1% Tween 80 was used as vehicle. Animals were sacrificed at 2 h post dose and the tissues were removed to measure 11 $\beta$ -HSD1 activity. Values are expressed as the means  $\pm$  SEM of  $n = 4$ . Statistical analysis was performed by One-way ANOVA, followed by Tukey. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. vehicle.

위에서 확인한 우수한 PD 효능에 근거하여 HF/STZ mouse를 이용한 질환 동물 모델에서 화합물 **25**의 in-vivo efficacy를 시험해 보기로 하였다. HF/STZ mouse 모델은 고혈당, 인슐린 저항성, 인슐린을 분비하는  $\beta$  cell의 감소 등 2형 당뇨병 환자에 서 발견되는 특징을 대부분 가지고 있는 항 당뇨 실험용 모델로 알려져 있다.<sup>28</sup>

HF/STZ mouse에 화합물 **25**를 50 mg/kg 용량으로 10일간 1일 2회 경구 투여한 후 혈당 및 혈중 인슐린 수준을 측정하였으며 양성 대조물질로 TZD계 당뇨병 치료제 인 rosiglitazone을 사용하여 비교하였다. Figure 6에서 보듯이 화합물 **25**는 HF/STZ mouse의 공복 혈당을 vehicle 투여 군 대비 46% 감소시켰으며 혈중 인슐린 역시 유의적으로 감소시켰다. 화합물 **25**의 투여는 HF/STZ mouse의 식이 섭취 및 체중에 영향을 주지 않았으며 비정상적인 임상증상 역시 관찰되지 않았기 때문에 화합물

**25**는 명확하게 항 당뇨 효능을 가지고 있는 것으로 판단되었다. 화합물 **25**의 혈당 감소 효능은 rosiglitazone의 효능과 유사한 수준이었으며, 강력한 insulin sensitizer로 알려진 rosiglitazone과 마찬가지로 혈중 인슐린 수준을 효과적으로 감소시켰다는 것은 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor인 화합물 **25** 역시 인슐린 저항성을 개선하는 효능을 가지고 있음을 간접적으로 보여주는 것이었다.



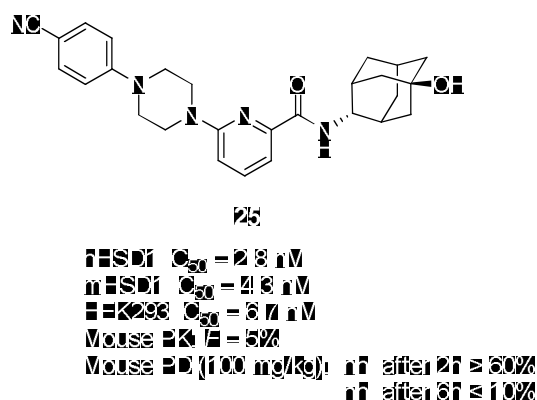
**Figure 6.** Effect of compound **25** on fasting blood glucose (A) and insulin levels (B) in HF/STZ mice. 5 mg/kg of rosiglitazone (RG) or 50 mg/kg of compound **25** was orally administered to HF/STZ mice twice daily for 10 days. Sterile water containing 0.5% methylcellulose and 1% Tween 80 was used as vehicle. On the last day, the blood glucose and insulin levels were measured after over-night fasting. Values are expressed as the means  $\pm$  SEM of  $n = 5$ . Statistical analysis was performed by One-way ANOVA, followed by Tukey. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. vehicle.

### III. 선도물질 최적화 연구

#### 1. 연구 방향성

유효물질 최적화 연구를 통해 도출된 picolinamide 화합물 **25**는 11 $\beta$ -HSD1에 대한 enzyme assay에서 유효물질 **1** 대비 20배 정도 증가된 in-vitro potency를 나타냈으며 cellular potency 역시 우수한 것으로 확인되었다. 또한 화합물 **25**는 화합물 **1** 보다 상당히 개선된 대사안정성을 나타냈으며 ex-vivo PD 모델 및 in-vivo efficacy 모델에서 용량의존적이고 유의적인 효능을 보여주었다는 점에서 유효물질에서 한층 진보된 선도물질 (lead compound)로 판단되었다.

그러나 선도물질 **25**는 경구투여를 통해 우수한 in-vivo efficacy를 발현하기 위해 비교적 많은 용량 (50 mg/kg 이상)과 1일 2회 투여가 필요한 것으로 나타났는데, 이는 경구투여 시의 매우 낮은 bioavailability (mouse에서  $F = 5\%$ )와 큰 clearance 때문으로 분석되었다. 실제로 mouse ex-vivo PD 모델에 화합물 **25**를 100 mg/kg 용량으로 경구 투여했을 때 투여 2시간 후에는 liver와 fat 조직에서 11 $\beta$ -HSD1의 활성을 60% 이상 억제하였으나 투여 6시간 후에는 두 조직 모두에서 억제율이 10% 이하로 측정되었다. (Figure 7)



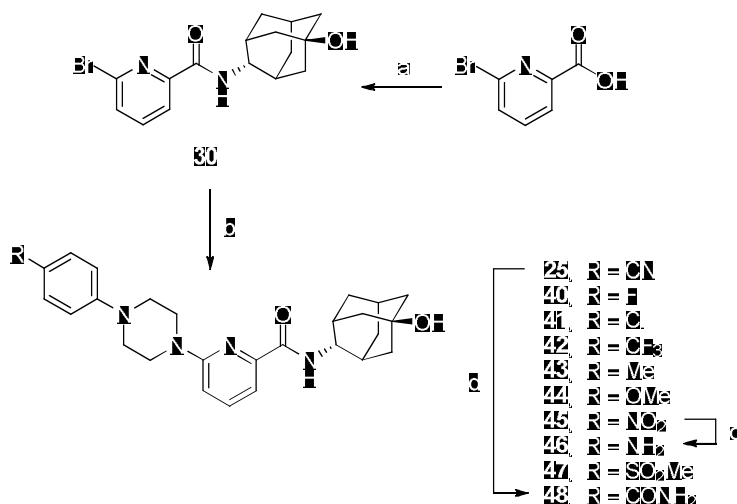
**Figure 7.** Chemical structure and biological profiles of lead compound **25**

따라서 선도물질 **25**에 대한 최적화 연구를 계획함에 있어 강력한 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성은 유지하면서 pharmacokinetic (PK) profile을 개선하는 것을 주된 목표로 설정하였다. 이를 위해 화합물 **25**의 *N*-phenylpiperazine moiety를 구조적으로 변형하여도 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성은 큰 영향을 받지 않을 것이며 대신 화합물의 물리화학적 성질과 PK profile은 조절될 것이라는 가설을 수립하였는데, 이는 유효물질 **1**의 최적화 과정에서 축적된 structure-activity relationship 정보에 근거한 것이었다. 결론적으로 선도물질 최적화 연구에서는 화합물 **25**의 왼쪽 부분에 위치한 phenyl ring 및 piperazine ring을 유사한 구조로 변형하거나 phenyl ring에 치환된 cyano group을 다른 substituent로 교체하는 등의 연구를 통해 PK profile을 개선하고, 이를 통해 PD 효능이 지속적이며 낮은 용량 및 1일 1회 경구투여를 통해서도 질환 동물모델에서 우수한 in-vivo efficacy를 나타내는 화합물을 도출하고자 하였다.

## 2. 신규 화합물의 합성

선도물질 **25**의 왼쪽 phenyl ring의 4번 위치에 치환된 cyano group을 다양한 다른 functional group으로 변형한 유도체 **40-48**은 Scheme 4에 제시된 방법에 따라 합성되었다. 먼저 기존과 마찬가지로 6-bromopicolinic acid와 *trans*-4-aminoadamantan-1-ol 사이에 HBTU를 이용한 coupling 반응을 수행하여 중간체 **30**을 수득한 후, 상업적으로 이용 가능하고 4번 위치가 치환된 다양한 1-phenylpiperazine과 palladium 촉매를 이용한 amination 반응을 수행하여 화합물 **25** 및 유도체 **40-45** 와 **47**을 합성하였다. 유효물질 최적화 연구 당시 화합물 **25** 등은 중간체 **30**과 1-phenylpiperazine을 microwave irradiation 반응하여 합성한 바 있으나 (Scheme 3) 대량합성 필요성에 대비하기 위하여 palladium 촉매를 이용한 반응을 확립하였으며, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>와 xantphos를 사용하는 방법을 통해<sup>29</sup> 화합물 **25** 및 다양한 phenylpiperazine 신규 유도체들이 효과적으로 합성될 수 있음을 확인하였다.

한편, cyano 화합물 **25**를 EtOH 용매 하에서 NaOH 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 수용액 처리하여 amide 화합물 **48**을 합성하였고,<sup>30</sup> nitro 화합물 **45**에 palladium 촉매를 이용한 hydrogenation 반응을 진행하여 amino 화합물 **46**을 합성하였다.



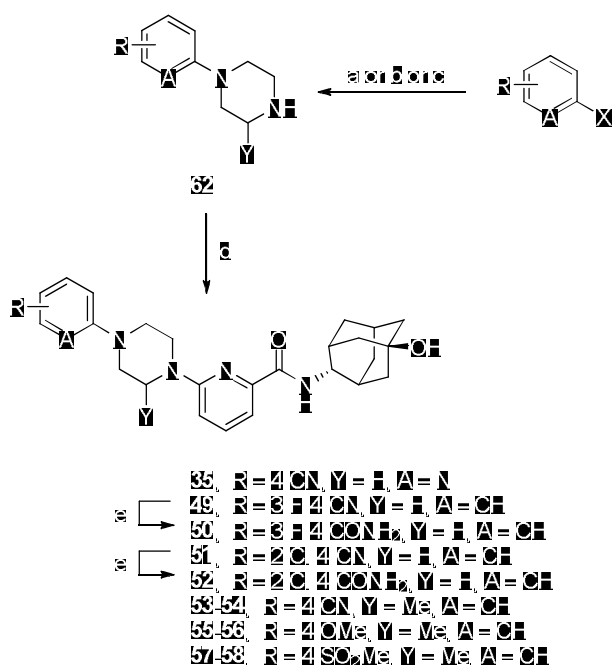
**Scheme 4.** Reagents and conditions: (a) *trans*-4-aminoadamantan-1-ol, HBTU, DIPEA, ACN, 85%; (b) 1-phenylpiperazines, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, xantphos, NaO<sup>t</sup>Bu, toluene, 100 °C, 24-84%; (c) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, MeOH, 75%; (d) 1N-NaOH, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EtOH, 58%.

선도물질 **25**의 왼쪽 phenyl ring을 pyridine ring으로 변형한 화합물 **35**와 phenyl ring에 두 개의 substituent를 도입한 화합물 **49-52**의 경우 중간체 **30**과 반응할 1-arylpiperazine reagent가 상업적으로 이용 가능하지 않아 해당 1-arylpiperazine을 직접 합성하여 최종 화합물의 합성에 사용하였다. (Scheme 5) 먼저 piperazine을 6-chloronicotinonitrile과 microwave irradiation 반응하거나 4-bromo-2-fluorobenzonitrile 또는 4-bromo-3-chlorobenzonitrile과 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> 및 BINAP을 이용한 amination 반응을 수행하여 3종의 arylpiperazine **62**를 합성하였다. 다음으로 Scheme 4에서와 동일하게 중간체 **30**과 arylpiperazine **62** 사이의 coupling 반응을 수행하여 신규 유도체 **35**, **49** 및 **51**을 합성하였으며, cyano 화합물 **49**와 **51**은 NaOH 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 수용액과 반응하여 amide 화합물 **50**과 **52**로도 각각 전환되었다.

한편, piperazine의 2번 위치에 methyl group을 도입한 유도체 **53-58** 역시 Scheme 5의 방법에 따라 합성되었다. 4번 위치가 각각 cyano, methoxy, methylsulfonyl로 치환된 bromobenzene과 (*R*)-2-methylpiperazine 또는 (*S*)-2-methylpiperazine 사이에



palladium을 촉매로 한 amination 반응을 진행하여 각각 3종의 (*R*)-3-methyl-1-phenylpiperazine 및 (*S*)-3-methyl-1-phenylpiperazine **62**를 합성한 후, 역시 중간체 **30**과 Buchwald 반응을 수행하여 유도체 **53-58**을 순수한 enantiomer로 합성하였다.

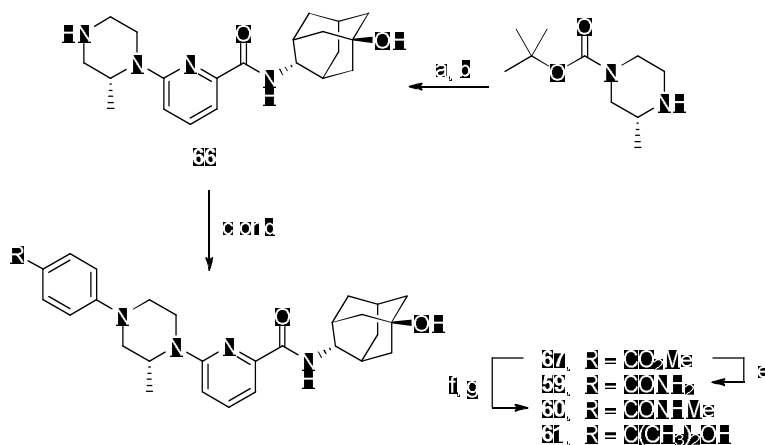


**Scheme 5.** Reagents and conditions: (a) piperazine, TEA, ACN, 150 °C, microwave, 73% (R = 4-CN, A = N, X = Cl); (b) piperazine, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, BINAP, NaO<sup>t</sup>Bu, toluene, 80 °C, 55-59% (R = 3-F-4-CN or 2-Cl-4-CN, A = CH, X = Br); (c) 2-methylpiperazine, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, BINAP, NaO<sup>t</sup>Bu, toluene, 100 °C, 28-69% (R = 4-CN or 4-OMe or 4-SO<sub>2</sub>Me, A = CH, X = Br); (d) **30**, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, xantphos, NaO<sup>t</sup>Bu, toluene, 100 °C, 19-73%; (e) 1N-NaOH, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EtOH, 60-92%.

한편, piperazine의 2번 위치에 methyl group을 도입한 유도체 **53-58**에 대한 활성 검색 결과 (*R*)-이성질체가 (*S*)-이성질체 대비 우수한 활성을 갖는 것으로 확인되었으며, 이에 따라 다수의 (*R*)-유도체를 더욱 효율적으로 합성할 수 있는 합성 경로를

개발하였다. 추가로 합성한 (*R*)-유도체 **59-61**은 Scheme 6에 제시된 새로운 방법에 따라 합성되었다. 먼저  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 와 xantphos를 사용하여 중간체 **30**과 (*R*)-4-*N*-BOC-2-methylpiperazine을 coupling한 후 TFA로 탈 보호하여 새로운 중간체 **66**을 수득하였다. 다음으로 중간체 **66**을 4번 위치가 치환된 bromobenzene과 적절한 palladium 촉매 조건에서 반응하여 신규 화합물 **61**과 ester 중간체 **67**을 합성하였다.

Ester 중간체 **67**은 DMF 용매 하에서 formamide 및 NaOMe를 처리하는 직접적인 amidation 반응을 통해 amide 유도체 **59**로 전환되거나, carboxylic acid로 가수분해한 후  $\text{MeNH}_2$ 과 HBTU를 사용하는 amide coupling 반응을 통해 methyl amide 유도체 **60**로 전환되었다.

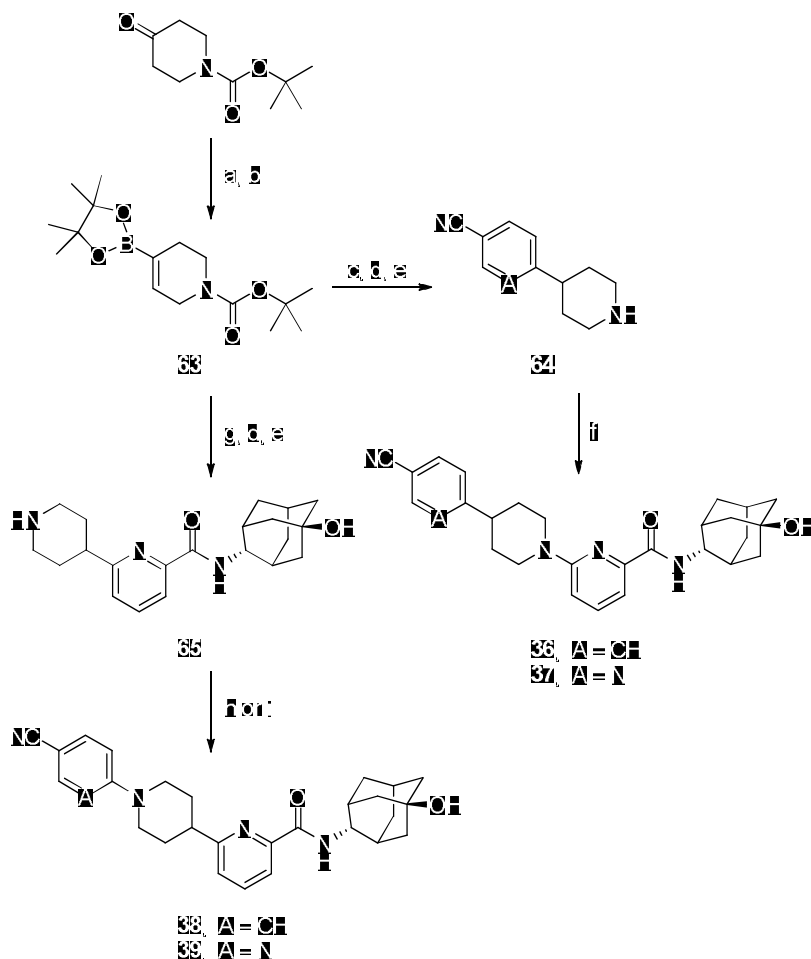


**Scheme 6.** Reagents and conditions: (a) **30**,  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , xantphos,  $\text{NaO}^t\text{Bu}$ , toluene,  $100^\circ\text{C}$ , 54%; (b) TFA, DCM, 92%; (c) methyl 4-bromobenzoate,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , xantphos,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , toluene,  $90^\circ\text{C}$ , 59% ( $\text{R} = \text{CO}_2\text{Me}$ ); (d) 2-(4-bromophenyl)propan-2-ol,  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , BINAP,  $\text{NaO}^t\text{Bu}$ , toluene,  $100^\circ\text{C}$ , 58% ( $\text{R} = \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ ); (e) formamide, NaOMe, DMF,  $100^\circ\text{C}$ , 44%; (f) 2N-NaOH, MeOH,  $80^\circ\text{C}$ , 74%; (g)  $\text{MeNH}_2$ , HBTU, DIPEA, ACN, 70%.

선도물질 **25**의 왼쪽 부분을 변형함에 있어 piperazine ring을 piperidine ring으로 대체하는 것 역시 고려되었는데, 이러한 phenylpiperidine 또는 piperidinylpyridine 유

도체 **36-39**는 Scheme 7에 제시된 방법에 따라 합성되었다. 먼저 1-BOC-4-piperidone 을 THF 용매 하에서 LDA 및 PhNTf<sub>2</sub>와 반응시켜 vinyl triflate 화합물을 합성한 후 여기에 bis(pinacolato)diboron와 palladium을 촉매로 한 cross-coupling 반응을 수행하여 boronate 화합물 **63**을 수득하였다.<sup>31</sup> 화합물 **63**을 다시 4-bromobenzonitrile 또는 6-bromonicotinonitrile과 PdCl<sub>2</sub>dppf를 매개로 coupling 하여 aryltetrahydropyridine 화합물을 합성한 후, hydrogenation 반응을 통해 이중결합을 포화시키고 TFA로 탈 보호하여 4-(piperidin-4-yl)benzonitrile 또는 6-(piperidin-4-yl)nicotinonitrile **64**를 합성하였다. 마지막으로 화합물 **64**와 중간체 **30**을 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>와 xantphos를 사용하여 반응시켜 신규의 4-phenylpiperidin-1-ylpicolinamide 화합물 **36-37**을 합성하였다.

한편, piperidine ring이 반대 방향으로 위치한 유도체를 합성하기 위해 boronate 화합물 **63**과 중간체 **30**을 먼저 반응시킨 후 hydrogenation 및 탈 보호 반응을 수행하여 중간체 **65**를 합성하였다. 중간체 **65**를 4-bromobenzonitrile과 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> 및 BINAP을 사용하여 coupling 하거나 6-chloronicotinonitrile과 고온에서 반응시켜 신규의 1-phenylpiperidin-4-ylpicolinamide 화합물 **38-39**를 합성하였다



**Scheme 7.** Reagents and conditions: (a) LDA, PhNTf<sub>2</sub>, THF, 52%; (b) bis(pinacolato)-diboron, PdCl<sub>2</sub>dppf, KOAc, 1,4-dioxane, 80 °C, 59%; (c) 4-bromobenzonitrile or 6-bromonicotinonitrile, PdCl<sub>2</sub>dppf, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 80 °C, 22-32%; (d) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, EtOH, 95-99%; (e) TFA, DCM, 77-94%; (f) **30**, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, xantphos, NaO<sup>t</sup>Bu, toluene, 100 °C, 35-60%; (g) **30**, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH, toluene, 100 °C, 90%; (h) 4-bromobenzonitrile, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, BINAP, NaO<sup>t</sup>Bu, toluene, 80 °C, 73% (A = CH); (i) 6-chloronicotinonitrile, TEA, ACN, 100 °C, 82% (A = N).

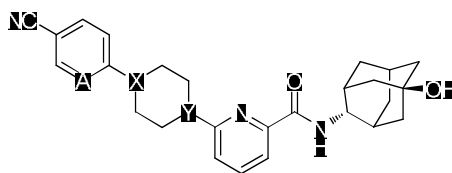
### 3. 활성 검색 및 구조-활성 관계 연구

합성된 화합물의 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성은 유효물질 최적화 연구에서와 동일하게 human 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay 및 cell-based assay를 이용하여 평가하였다. 다만 선도물질 최적화 연구에서는 enzyme assay 뿐 아니라 cellular assay에서도 IC<sub>50</sub> 값을 산출하여 화합물의 cell에서의 활성을 보다 정밀하게 비교하고자 하였다. 또한 mouse liver microsome을 이용하여 각 화합물에 대한 대사안정성 평가 역시 동일하게 수행하였다.

먼저 선도물질 **25**의 cyano group을 유지하면서 phenylpiperazine moiety를 변형한 유도체 **35-39**에 대한 활성 및 대사안정성 검색 결과를 Table 5에 나타내었다. 앞에서 설명한 바와 같이 이 화합물들은 선도물질 **25**의 phenyl ring을 pyridine ring으로 변형하거나 piperazine ring을 piperidine ring으로 변형하는 것이 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성에는 큰 영향을 주지 않으면서 화합물의 물리화학적 성질 및 대사안정성을 변화시켜 PK profile을 개선하는지 여부를 확인하기 위해 합성된 것이었다. Table 5에서 보듯이 pyridinylpiperazine 유도체 **35**는 선도물질 **25**와 비교할 때 enzyme assay에서의 활성이 다소 증가하였으며 대사안정성 역시 유사한 수준을 유지하였다. 그러나 화합물 **35**는 cellular assay에서의 활성이 화합물 **25** 대비 약 2배 정도 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 화합물의 lipophilicity 감소가 cell permeability의 감소로 이어져 cell 내의 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 작용을 약화시켰기 때문으로 추정되었다.

Piperazine ring 대신 piperidine ring을 도입한 유도체 **36-39** 역시 enzyme assay에서의 활성은 화합물 **25**와 유사한 수준인 것으로 확인되었다. 그러나 이 화합물들은 모두 cell-based assay에서의 활성이 상당히 감소하였으며 명확한 structure-activity relationship이 분석되지 않았다. 더욱이 이 화합물들은 화합물 **25** 대비 미흡한 대사안정성을 보여주었으며 (mouse liver microsome에서 30분 후 잔류량 45~65%), 따라서 선도물질 **25**의 최적화에 있어 piperazine ring의 piperidine ring으로의 변형은 적절하지 않은 것으로 판단되었다.

**Table 5.** *In vitro* data of the phenylpiperazine modified derivatives



Compd	A	X	Y	hHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	HEK293 <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (nM)	MLM MST <sup>b</sup> (%R <sub>30min</sub> )
<b>25</b>	CH	N	N	2.8	6.7	88
<b>35</b>	N	N	N	2.4	12	81
<b>36</b>	CH	CH	N	6.8	57	46
<b>37</b>	N	CH	N	3.5	29	63
<b>38</b>	CH	N	CH	2.2	11	58
<b>39</b>	N	N	CH	3.8	18	52

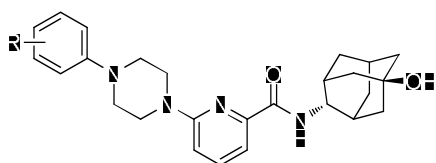
<sup>a</sup> HEK293 cells stably transfected with human 11 $\beta$ -HSD1 cDNA

<sup>b</sup> Metabolic stability test using mouse liver microsomes

다음으로 선도물질 **25**의 phenyl ring의 4번 위치에 치환된 cyano group을 다른 functional group으로 변형한 유도체 **40-52**에 대한 활성 및 대사안정성 검색 결과를 Table 6에 나타내었다. Table 5에서 분석된 structure-activity relationship에 근거하여 이들 유도체는 phenylpiperazine moiety를 유지하면서 합성되었다. Table 6에서 보듯이 phenyl ring의 4번 위치가 치환된 phenylpiperazine 화합물들은 모두 human 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay에서 10 nM 이하의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내는 강력한 in-vitro potency를 보여주었다. 그러나 substituent의 종류와 성격이 유도체의 활성에 약간의 영향을 주고 있다는 사실을 발견할 수 있었는데, 예를 들어 halogen, trifluoromethyl, methyl 등의 lipophilic substituent가 도입된 화합물들 (**40-43**)의 경우 enzyme assay 및 cellular assay에서의 활성이 다소 감소하는 경향을 나타냈고 반대로 hydrogen bond acceptor

를 포함한 hydrophilic substituent가 도입된 화합물들 (44-45, 47-48)의 경우 enzyme assay에서의 활성이 선도물질 25 대비 개선되는 모습을 보여주었다. 기존에 수행한 유효물질 1과 11 $\beta$ -HSD1 protein의 docking 연구에서 화합물의 왼쪽 부분이 solvent-exposed area를 향해 위치함을 확인한 바 있었으며, 따라서 물 분자를 매개로 한 hydrogen bonding이 가능하도록 phenyl ring의 4번 위치에 hydrogen bond acceptor를 포함한 polar substituent를 도입하는 것이 화합물의 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성을 개선하는데 유리한 것으로 판단되었다.

Polar functional group을 도입한 이 화합물들은 대사안정성 역시 비교적 우수했으나 화합물 47을 제외한 나머지 화합물들의 경우 cell-based assay에서의 활성이 선도물질 25와 비교할 때 2~3배 정도 감소하는 것으로 나타났다. 이 역시 lipophilicity 감소에 의한 화합물의 cell permeability 감소 때문으로 추정되었으며, enzyme assay에서 활성이 가장 우수했던 amide 화합물 48의 lipophilicity를 증가시켜 이를 극복해 보고자 하였다. 예상대로 화합물 48의 phenyl ring에 halogen을 추가로 도입한 유도체 50 및 52는 enzyme assay에서의 활성이 화합물 48 대비 다소 감소했음에도 불구하고 cellular assay에서의 활성은 화합물 48 대비 2~3배 정도 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 화합물 50과 52는 예상하지 못했던 대사안정성의 급격한 감소로 인해 추가 연구의 대상에서 제외되었다.

**Table 6.** *In vitro* data of the phenyl ring modified derivatives

Compd	R	hHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	HEK293 <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (nM)	MLM MST <sup>b</sup> (%R <sub>30min</sub> )
25	4-CN	2.8	6.7	88
40	4-F	4.2	19	73
41	4-Cl	3.1	9.5	69
42	4-CF <sub>3</sub>	3.4	23	79
43	4-Me	3.6	35	74
44	4-OMe	2.0	15	86
45	4-NO <sub>2</sub>	2.1	11	74
46	4-NH <sub>2</sub>	8.7	41	97
47	4-SO <sub>2</sub> Me	1.6	3.9	87
48	4-CONH <sub>2</sub>	0.9	21	65
49	3-F, 4-CN	5.5	22	79
50	3-F, 4-CONH <sub>2</sub>	2.3	12	28
51	2-Cl, 4-CN	4.3	13	88
52	2-Cl, 4-CONH <sub>2</sub>	1.8	7.8	32

<sup>a</sup> HEK293 cells stably transfected with human 11β-HSD1 cDNA<sup>b</sup> Metabolic stability test using mouse liver microsomes

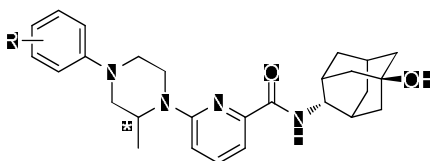


마지막으로 piperazine ring 자체에 대한 수식으로서 piperazine ring의 2번 위치에 methyl group을 도입하는 연구를 진행하였으며 이들 유도체 **53-61**에 대한 활성 및 대사안정성 검색 결과를 Table 7에 나타내었다. 2-Methyl-4-aryl piperazine 구조는 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor에 관련한 몇몇의 문헌에서 발견되는 형태인데,<sup>32</sup> 저자는 이 사실에 주목하여 이 구조가 화합물과 11 $\beta$ -HSD1 enzyme 사이의 interaction에 있어 잠재적으로 중요한 역할을 하거나 적어도 화합물의 PK profile 또는 drug-likeness를 개선하는데 도움을 줄 것으로 생각하였다.

Table 7에서 보듯이 phenyl ring의 4번 위치에 각각 cyano, methoxy, methylsulfonyl이 치환된 기존 화합물 **25, 44, 47**에 대해 piperazine ring을 (*R*)-2-methylpiperazine으로 대체한 화합물 **53, 55, 57**은 enzyme assay에서의 활성이 각각의 원래 화합물 대비하여 다소 감소하였으나 cell-based assay에서의 활성은 개선되는 모습을 보여주었다. 반면에 (*S*)-2-methylpiperazine 화합물 **54, 56, 58**은 enzyme assay 및 cellular assay 모두에서 각각의 (*R*)-이성질체와 비교할 때 약 2배 정도 낮은 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라 대사안정성에 있어서도 3종의 (*R*)-이성질체가 모두 각각의 (*S*)-이성질체에 대비하여 우수하였다.

이상의 결과에 근거하여 (*R*)-2-methylpiperazine이 도입된 수종의 유도체를 추가로 합성하여 그 활성 및 대사안정성을 검색하였다. Amide 유도체 **59**와 **60**의 경우 enzyme assay에서의 활성은 우수하였으나 cell-based assay에서의 활성 및 대사안정성이 상대적으로 낮았는데 이는 기존 amide 화합물들 (**48, 50, 52**)의 특징과 일치되는 결과였다. 한편, phenyl ring의 4번 위치에 propan-2-ol 기를 도입한 화합물 **61**은 enzyme assay 및 cellular assay에서의 활성과 대사안정성 모두에서 전반적으로 우수한 결과를 보여주었다.

**Table 7.** *In vitro* data of methyl substituted piperazine derivatives



Compd	R	Config.	hHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	HEK293 <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (nM)	MLM MST <sup>b</sup> (%R <sub>30min</sub> )
<b>53</b>	4-CN	<i>R</i>	3.5	5.4	84
<b>54</b>	4-CN	<i>S</i>	6.6	9.8	82
<b>55</b>	4-OMe	<i>R</i>	2.7	6.0	80
<b>56</b>	4-OMe	<i>S</i>	5.3	14	77
<b>57</b>	4-SO <sub>2</sub> Me	<i>R</i>	2.2	3.1	97
<b>58</b>	4-SO <sub>2</sub> Me	<i>S</i>	4.2	6.8	88
<b>59</b>	4-CONH <sub>2</sub>	<i>R</i>	1.5	8.2	57
<b>60</b>	4-CONHMe	<i>R</i>	3.8	9.2	61
<b>61</b>	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	<i>R</i>	4.1	4.9	84

<sup>a</sup> HEK293 cells stably transfected with human 11 $\beta$ -HSD1 cDNA

<sup>b</sup> Metabolic stability test using mouse liver microsomes

#### 4. PK, PD 및 질환모델 시험

추가적인 biological evaluation을 수행하기 위해 탁월한 human 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성 (enzyme assay 및 cellular assay 모두에서 IC<sub>50</sub> 값이 5 nM 이하)과 우수한 대사안정성 (mouse liver microsome에서 30분 후 잔류량 80% 이상)을 보유한 화합물 **47**, **57**, **61**을 선정하였다. 이 화합물들에 대한 추가 연구는 human 11 $\beta$ -HSD2에 대한 선택성 평가, mouse 11 $\beta$ -HSD1에 대한 활성 평가, mouse를 이용한 in-vivo PK 및 ex-vivo PD 시험을 포함하여 진행되었다.

그 결과, 화합물 **47**, **57**, **61**은 모두 human 11 $\beta$ -HSD2에 대한 IC<sub>50</sub> 값이 10  $\mu$ M 이상으로 측정되어 11 $\beta$ -HSD2 대비 11 $\beta$ -HSD1에 대한 선택성이 1000배 이상인 것으로 확인되었고, mouse 11 $\beta$ -HSD1에 대해서도 모두 충분한 억제 활성 (enzyme assay에서의 IC<sub>50</sub> 값이 10 nM 이하)을 나타내어 mouse를 이용한 다양한 효능 시험이 가능할 것으로 판단되었다. 무엇보다도 이 화합물들은 mouse에서의 in-vivo PK 시험 결과 oral bioavailability가 각각 17%, 41%, 32%로 측정되어 선도물질 **25** 대비 상당히 개선된 PK profile을 나타내었다. (Table 8)

**Table 8.** *In vitro* inhibition and *in vivo* PK data of compounds **47**, **57**, and **61**

Compd	hHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	mHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	hHSD2 IC <sub>50</sub> (nM)	In vivo mouse PK <sup>a</sup>	
				CL (iv, L/kg/h)	F (po, %)
<b>47</b>	1.6	2.5	> 10000	1.78	17
<b>57</b>	2.2	1.8	> 10000	0.85	41
<b>61</b>	4.1	6.6	> 10000	0.46	32

<sup>a</sup> Dosed iv at 5 mg/kg, po at 20 mg/kg

다음으로 화합물 **47**, **57**, **61**의 ex-vivo PD 효능과 그 지속성을 평가하기 위하여 male C57BL/6 mouse에 각각의 화합물을 30 mg/kg 용량으로 경구투여하고 투여 2시

간 및 6시간 후에 mouse의 liver와 EPF를 채취하여 유효물질 최적화 연구에서와 동일한 방법으로 liver 또는 EPF 조직에 존재하는 11 $\beta$ -HSD1에 대한 각 화합물의 억제 활성을 측정하였다.

Table 9에서 보듯이 선도물질 **25** 대비 개선된 oral bioavailability를 고려하여 투여 용량을 30 mg/kg로 낮추었음에도 불구하고 화합물 **47**, **57**, **61**은 모두 투여 2시간 후 liver와 fat 조직 모두에서 11 $\beta$ -HSD1의 활성을 유의적으로 크게 감소시켰다. 그러나 화합물 **47**의 경우 liver와 fat 조직에서의 11 $\beta$ -HSD1 억제 효능이 투여 6시간 후에 급격히 감소하였는데 이는 화합물 **47**의 높은 clearance (1.78 L/kg/h) 때문인 것으로 추정되었다. 화합물 **57**은 세 화합물 중 가장 우수한 mouse PK profile ( $F$  = 41%,  $CL$  = 0.85 L/kg/h)을 나타낸 바 있는데, mouse ex-vivo PD 시험에서도 가장 우수한 11 $\beta$ -HSD1 억제 효능 (투여 2시간 후 liver와 EPF 조직에서 각각 85%, 95% 억제)을 나타냈으며 그 효능은 투여 6시간 후까지 상당히 유지 (투여 6시간 후 liver와 EPF 조직에서 각각 77%, 86% 억제)되었다. 이 결과는 화합물 **47**의 piperazine ring의 2번 위치에 (*R*)-methyl group을 도입하는 간단한 변형 (**57**)이 화합물의 PK profile을 대폭 개선하여 생체 내의 타겟 조직에서 더욱 강력하고 지속적인 11 $\beta$ -HSD1 억제 효능을 가져왔음을 보여주고 있다. 한편, 화합물 **61**은 투여 2시간 및 6시간 후, liver와 fat 조직 모두에서 비교적 우수한 11 $\beta$ -HSD1 억제 효능을 보여주었지만 화합물 **57**과 비교할 때 다소 미약한 것으로 판단되었다.

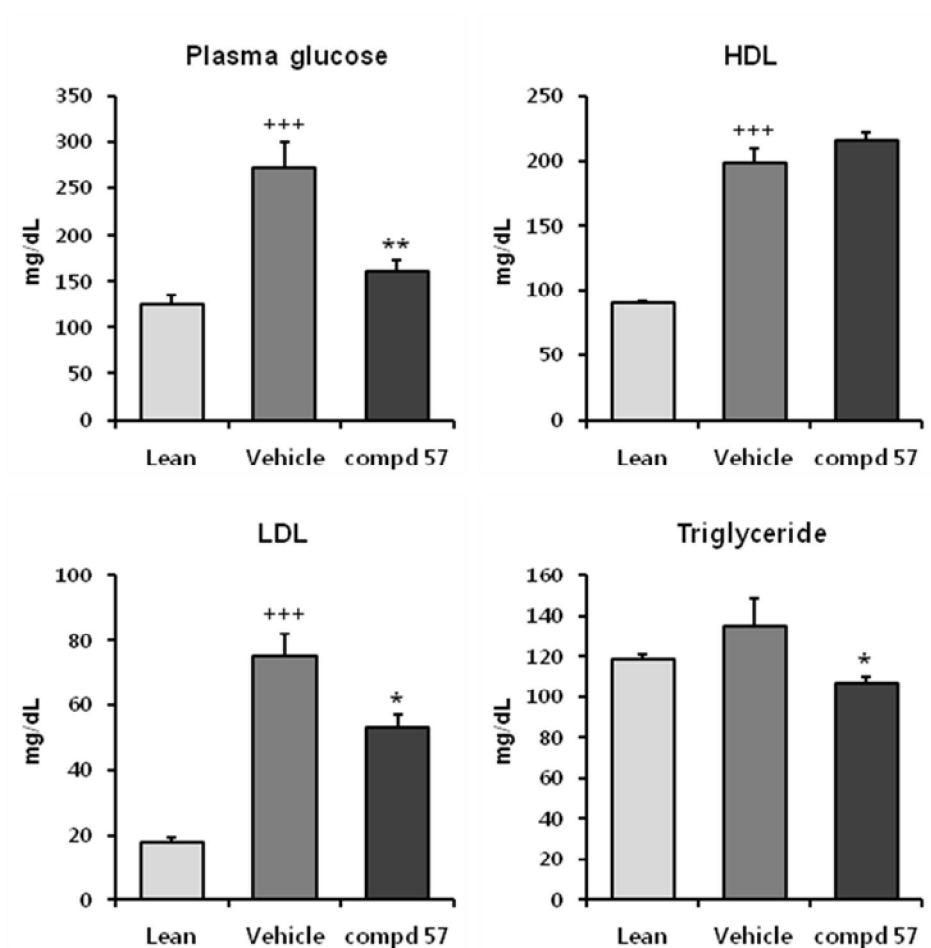
**Table 9.** *Ex vivo* PD data of compounds **47**, **57**, and **61**

Compd	Ex vivo mouse PD <sup>a</sup> (%inh.)			
	Liver		EPF	
	2 h	6 h	2 h	6 h
<b>47</b>	53	15	70	22
<b>57</b>	85	77	95	86
<b>61</b>	73	58	94	77

<sup>a</sup> Dosed po at 30 mg/kg

가장 우수한 PK profile과 PD 효능을 보여준 화합물 **57**에 대해 *ob/ob* mouse를 이용하여 그 in-vivo efficacy를 시험해 보았다. *Ob/ob* mouse는 C57BL/6 mouse에 식욕 억제에 관련된 leptin gene을 mutation 시킨 유전적 비만 질환모델이면서 동시에 고혈당 및 인슐린 저항성이 유발되는 2형 당뇨 질환모델로서, 당뇨 및 비만 치료용 후보물질의 전임상 효능시험에 널리 이용되고 있다.<sup>33</sup>

Figure 8에서 보듯이 *ob/ob* mouse는 동종의 일반 mouse와 비교할 때 혈당, HDL 및 LDL-cholesterol이 유의적으로 증가해 있으며 혈중 triglyceride 수준 역시 높은 경향성을 보여주고 있다. 화합물 **57**의 경우 선도물질 **25**와 달리 30 mg/kg 용량에서도 충분한 PD 효능이 발현되고 그 효능이 6시간 이상 지속됨을 고려하여, *ob/ob* mouse에 화합물 **57**을 30 mg/kg 용량으로 10일간 1일 1회 경구 투여하였다. 투여 10일 후 비절식 상태에서 혈당을 측정한 결과 화합물 **57**은 *ob/ob* mouse의 혈당을 vehicle 투여 군 대비 41% 정도 유의적으로 낮추었으며, 혈중 LDL-cholesterol 및 triglyceride 수준 역시 유의적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다. 화합물 **57**의 투여는 HDL-cholesterol을 다소 증가시키는 경향성을 보여주었으나 그 변화가 크지는 않았다. 한편, 화합물 **57**은 *ob/ob* mouse의 식이 섭취 및 체중에 영향을 주지 않았으며 비정상적인 임상증상 역시 관찰되지 않았다. 이 결과는 화합물 **57**이 11 $\beta$ -HSD1 억제 기전을 통하여 혈당 및 혈중 lipid profile을 동시에 개선시켰음을 보여준 것이며, 따라서 강력하고 선택적인 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor는 2형 당뇨뿐 아니라 hyperlipidemia 등의 lipid disorder의 치료에도 효과적일 것으로 사료되었다.

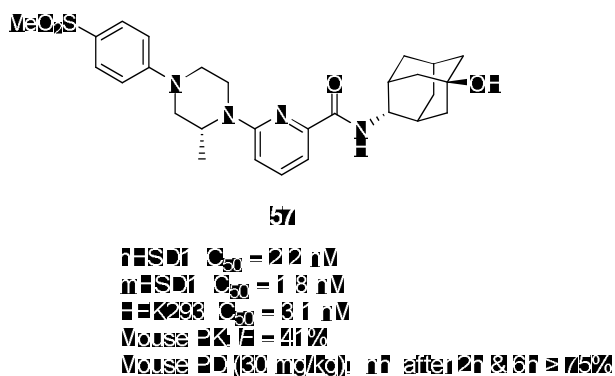


**Figure 8.** Effect of compound **57** on non-fasting plasma glucose levels and lipid profiles in *ob/ob* mice. Compound **57** was orally administered to *ob/ob* mice at 30 mg/kg once daily for 10 days. Sterile water containing 0.5% methylcellulose and 1% Tween 80 was used as vehicle. Non-fasting plasma glucose, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglyceride levels were measured after 10 days treatment. Values are expressed as the means  $\pm$  SEM of  $n = 6$ . Statistical analysis was performed by Student's *t*-test. <sup>+++</sup> $p < 0.001$  vs. lean, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle.

## IV. 전임상 후보물질 도출 연구

### 1. 연구 방향성

선도물질 최적화 연구를 통해 도출된 화합물 **57**은 선도물질 **25**에 대비하여 enzyme assay 및 cellular assay 시의 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성이 증가했을 뿐 아니라 PK profile과 PD 효능이 상당히 개선되었다. (Figure 9) 특히 PD 효능의 지속성으로 인해 1일 1회 경구투여로도 질환모델에서 우수한 혈당 강하 및 lipid profile 개선 효능을 보여주었다. 그러나 전임상 후보물질로서의 가능성을 확인하기 위해 다양한 시험을 수행해본 결과 화합물 **57**은 비교적 낮은 농도에서 CYP3A4 및 hERG channel을 억제하는 것으로 확인되었다.



**Figure 9.** Chemical structure and biological profiles of advanced lead **57**

Cytochrome P450 (CYP)은 간에서 약물대사를 담당하는 핵심 enzyem으로서 병용 투여된 두 가지 약물이 동일한 CYP isozyme에 대해 경쟁할 때 약물상호작용 (drug-drug interaction)의 이슈가 발생한다. 즉 병용 투여된 약물 중 한 약물이 어떤 CYP isozyme을 inhibition할 경우 동일한 CYP isozyme에 의해 대사되는 다른 한 약물의 혈중농도가 예상치 않은 수준으로 상승하여 독성을 나타낼 수 있다. 따라서 drug

candidate에서 강한 CYP inhibition profile이 확인될 경우 그 개발이 중단되거나 사용이 제한되고 있다.<sup>34</sup>

hERG (human ether-a-go-go related gene) channel은 심장의 근육조직에 발현되는 potassium ( $K^+$ ) channel로서 다른 ion channel들과 함께 심장의 action potential을 형성하는데 중요한 역할을 수행한다. 심장 세포막의 action potential은 sodium ( $Na^+$ ) channel을 통한  $Na^+$  ion의 빠른 세포 내 유입에 의해 depolarization 되면서 시작되어 calcium ( $Ca^{2+}$ ) channel을 통한  $Ca^{2+}$  ion의 유입에 의해 유지되다가 potassium channel에 의해  $K^+$  ion이 세포 밖으로 이동하면서 repolarization 되는데, hERG channel은 이를 담당하는 중요한 potassium channel로 알려져 있다. 따라서 약물에 의한 hERG blocking은  $K^+$  ion의 흐름을 방해하여 심장 세포의 repolarization을 지연시키고 결과적으로 부정맥에 의한 심장 부작용을 초래할 수 있다.<sup>35</sup>

Table 10에서 보듯이 화합물 **57**은 human liver microsome을 사용하여 5종의 주요 CYP isozyme에 대해 수행한 CYP inhibition assay에서 CYP3A4 및 CYP2C19에 대한 억제력을 나타내었다. 특히 CYP isozyme에 의한 약물대사 중 약 50% 정도를 담당하는 것으로 알려져 있는 CYP3A4에 대해 1  $\mu M$  수준의 낮은  $IC_{50}$  값을 나타냈다는 점에서 화합물 **57**의 약물 상호작용 가능성은 상당히 높다고 판단되었다. 또한 patch clamp 방식으로 수행한 hERG channel assay에서 화합물 **57**의  $IC_{50}$  값은 4.7  $\mu M$ 로 측정되었는데, 이 역시 화합물 **57**이 hERG blocking에 의한 심장 부작용에 대해 충분한 safety margin을 확보했다고 판단하기에는 다소 낮은 농도로 생각되었다.

**Table 10.** CYP and hERG inhibition data of compound **57**

Compd	CYP <sup>a</sup> $IC_{50}$ ( $\mu M$ )					hERG <sup>b</sup> $IC_{50}$ ( $\mu M$ )
	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4	
<b>57</b>	>10	>10	3.7	>10	0.97	4.7

<sup>a</sup> Assays were done in pooled human liver microsomes.

<sup>b</sup> Patch clamp assay was performed using CHO cell stably expressing hERG gene.



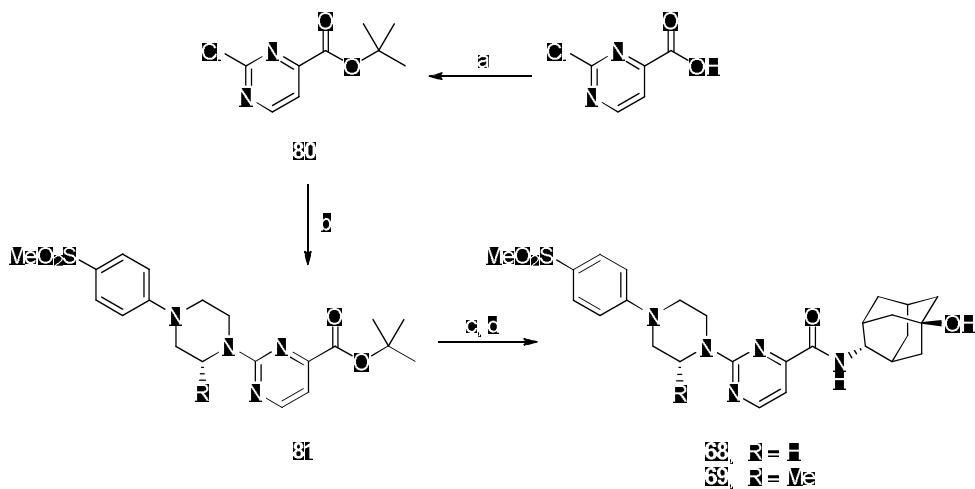
따라서 전임상 후보물질을 도출하기 위해서는 화합물 **57**에 대한 추가적인 최적화 연구가 요구되었으며, 그 방향성은 기존의 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성, PK profile, PD 효능을 유지 또는 개선하면서 CYP inhibition 및 hERG blocking 이슈를 극복하는 것이었다. 일반적으로 CYP inhibition을 줄이기 위한 구조변형 전략으로는 (1) 분자의 lipophilicity를 감소시키는 것, (2) 분자 내 heterocycle의 nitrogen과 CYP의 heme group 사이의 interaction을 감소시키기 위해 steric hindrance를 도입하는 것, (3) nitrogen의 pK<sub>a</sub>를 감소시키기 위해 halogen 등의 substituent를 도입하는 것 등이 제시되고 있다.<sup>36</sup> 또한 hERG blocking을 줄이기 위한 구조변형 전략으로는 (1) amine의 pK<sub>a</sub>를 감소시키는 것, (2) 분자의 lipophilicity를 감소시키는 것, (3) acid moiety 또는 oxygen hydrogen bond acceptor를 도입하는 것 등이 주로 사용되고 있다.<sup>37</sup>

저자는 CYP inhibition 및 hERG blocking를 회피하기 위하여 공통적으로 사용되는 화합물 최적화 방법에 주목하였는데, 그것은 분자의 lipophilicity를 감소시키는 것과 heterocyclic amine의 basicity를 감소시키는 것이었다. 그리고 이를 화합물 **57**에 적용하기 위해서는 화합물의 핵심 골격을 구성하고 있는 pyridine ring의 변형이 필요하다고 판단하였다. Pyridine ring을 대체할 새로운 heterocycle로는 pyrimidine ring이 고려되었는데, 이를 통해 분자의 3차원 구조에는 큰 영향을 주지 않으면서 heterocyclic amine의 basicity를 감소시키고 전체 분자의 lipophilicity 역시 감소시킬 수 있기 때문이었다. 본 연구에서는 우수한 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성을 가진 기존의 picolinamide 화합물을 새로운 pyrimidine-4-carboxamide 구조의 화합물로 변형하여 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor로서의 가능성을 확인하고, 추가 최적화 연구를 통하여 전임상 후보물질로서 적합한 profile을 갖는 화합물을 도출하고자 하였다.

## 2. 신규 화합물의 합성

Pyrimidine-4-carboxamide 화합물의 가능성을 확인하기 위하여 먼저 기존 화합물 **47**과 **57**에 대해 pyridine ring을 pyrimidine ring으로 변형한 신규 유도체 **68**과 **69**를 설계하였는데 이 화합물들은 Scheme 8에 제시된 방법에 따라 합성되었다.

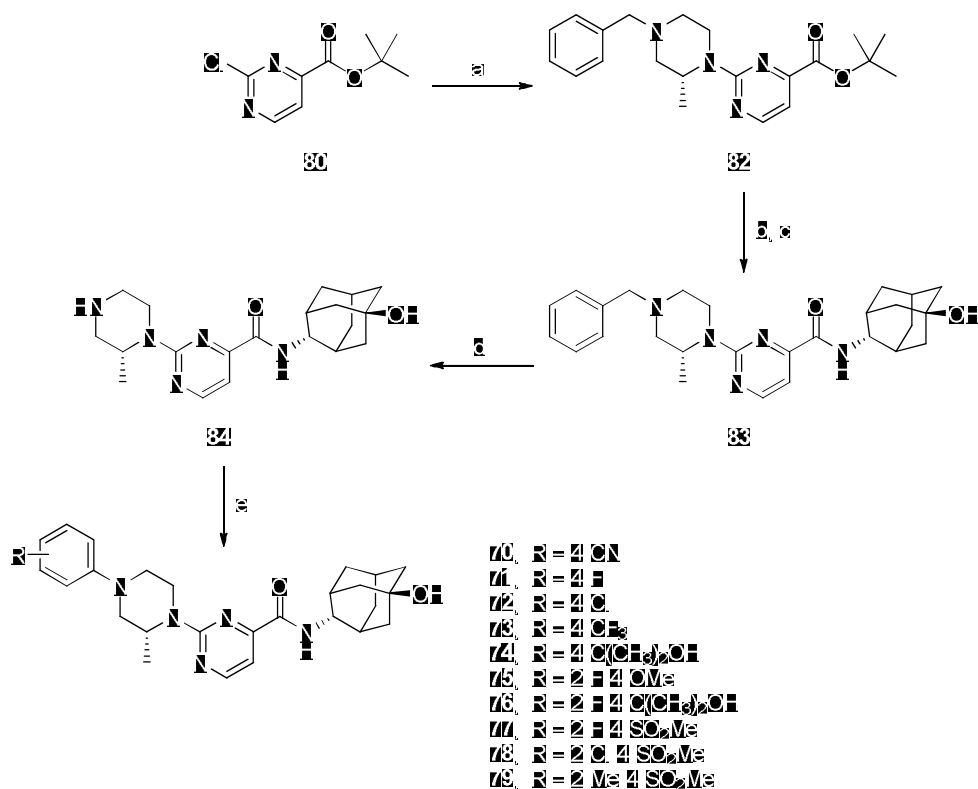
2-Chloropyrimidine-4-carboxylic acid를 <sup>t</sup>BuOH 용매에서 *p*-toluenesulfonyl chloride 및 pyridine 처리하여 carboxylic acid를 *tert*-butyl group으로 보호한 후<sup>38</sup> Scheme 4 및 Scheme 5에서 사용했던 1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine 또는 (*R*)-3-methyl-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-piperazine과 반응시켜 2-(4-phenylpiperazin-1-yl)pyrimidine 화합물 **81**을 합성하였다. 이들을 각각 TFA로 탈 보호하고 *trans*-4-aminoadamantan-1-ol과 HBTU를 이용한 coupling 반응을 수행하여 pyrimidine-4-carboxamide 유도체 **68** 과 **69**를 높은 수율로 합성하였다.



**Scheme 8.** Reagents and conditions: (a) *p*-toluenesulfonyl chloride, pyridine, <sup>t</sup>BuOH, 62%; (b) 1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine or (*R*)-3-methyl-1-(4-(methylsulfonyl)-phenyl)piperazine, DIPEA, ACN, 100 °C, 85-91%; (c) TFA, DCM, quantitative yield; (d) *trans*-4-aminoadamantan-1-ol, HBTU, DIPEA, ACN, 80-82%.

한편, (*R*)-2-methylpiperazine moiety를 고정하고 phenyl ring에 다양한 substituent를 도입한 다수의 유도체를 효율적으로 합성하기 위하여 새로운 합성 경로를 개발하였다. 신규 pyrimidine-4-carboxamide 유도체 **70-79**는 아래 Scheme 9에 제시된 방법에 따라 합성되었다.

먼저 *tert*-butyl group으로 보호된 화합물 **80**을 (*R*)-1-benzyl-3-methylpiperazine과 반응시켜 (*R*)-2-(4-benzyl-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine **82**를 수득한 후, Scheme 8에서와 동일하게 TFA를 사용하여 *tert*-butyl group을 선택적으로 제거하고 *trans*-4-aminoadamantan-1-ol과 coupling 반응을 수행하여 화합물 **83**을 합성하였다. 여기에 palladium을 촉매로 한 hydrogenation 반응을 진행하여 benzyl group을 제거한 후, 합성된 중간체 **84**를 다양하게 치환된 bromobenzene과 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> 및 BINAP 존재 하에서 반응시켜 신규 화합물 **70-79**를 효과적으로 합성하였다.<sup>39</sup>



**Scheme 9.** Reagents and conditions: (a) (*R*)-1-benzyl-3-methylpiperazine, DIPEA, ACN, 100 °C, 94%; (b) TFA, DCM, quantitative yield; (c) *trans*-4-aminoadamantan-1-ol, HBTU, DIPEA, ACN, 68%; (d) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 81%; (e) bromobenzenes, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, BINAP, NaO<sup>t</sup>Bu, toluene, 100 °C, 41-63%.

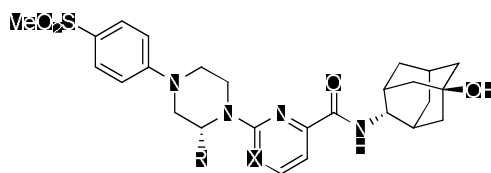
### 3. 활성 검색 및 구조-활성 관계 연구

전임상 후보물질 도출 연구에서 합성된 화합물에 대한 1차 검색은 기존의 유효 물질 및 선도물질 최적화 연구에서와 달리 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay를 제외하고 11 $\beta$ -HSD1 cellular assay 및 mouse liver microsome을 이용한 대사안정성 평가로 진행하였다. 이는 cell 내에 존재하는 11 $\beta$ -HSD1에 대한 in-vitro potency를 평가함에 있어 cell-based assay가 보다 중요하다고 생각했기 때문이며, 이를 통해 보다 효율적이고 신속한 화합물 검색이 가능하였다. 대신 mouse를 이용한 ex-vivo PD assay를 다수의 화합물에 대해 초기에 수행하였는데, 이는 PD assay가 in-vivo PK 시험보다 빠르고 용이하게 그 결과를 도출할 수 있음에도 불구하고 화합물의 효과적인 흡수 및 분포 여부를 충분히 반영할 뿐만 아니라 기전에 근거한 in-vivo efficacy 발현에 있어 기본적인 요소라고 판단했기 때문이었다. 다수 화합물에 대해 검색 용으로 진행한 PD assay에서는 화합물 투여 2시간 후의 효능만을 우선적으로 측정하였으며, 기존에 PD 효능이 가장 우수했던 화합물 **57**의 경우 30 mg/kg 투여 2시간 후의 11 $\beta$ -HSD1 억제 효능이 85~95% 수준으로 매우 높았음을 감안하여 시험의 변별력을 높이기 위해 투여 용량을 10 mg/kg로 낮추어 진행하였다.

먼저 기존의 picolinamide 화합물 **47**, **57** 및 신규 pyrimidine-4-carboxamide 화합물 **68**, **69**의 활성, 대사안정성, ex-vivo PD assay 결과를 Table 11에 나타내었다. 앞에서 설명한 바와 같이 화합물 **68**, **69**는 기존 화합물 중 cellular potency가 가장 우수했던 4-(methylsulfonyl)phenylpiperazine 유도체 **47**, **57**에 대하여 중앙의 pyridine ring 만을 pyrimidine ring으로 변형하여 pyrimidine-4-carboxamide 구조의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor로서의 가능성을 확인하기 위해 합성한 것이었다. Table 11에서 보듯이 pyrimidine-4-carboxamide 유도체 **68**는 나머지 부분이 동일한 picolinamide 유도체 **47** 대비 7배 정도 낮은 cellular potency를 나타내었다. 다만 대사안정성이 화합물 **47** 대비 다소 개선된 것으로 평가되어 ex-vivo PD assay를 수행해 보았으나 mouse에 10 mg/kg 용량을 경구 투여한 2시간 후 liver 및 EPF에서 11 $\beta$ -HSD1을 전혀 억제하지 못하는 것으로 나타났다. 한편, piperazine의 2번 위치에 (*R*)-methyl group이 도입된 pyrimidine-4-carboxamide 유도체 **69**는 나머지 부분이 동일한 picolinamide 유도체 **57**에 대비하여 cellular potency가 2~3배 정도 감소하였으나 8.5 nM의 비교적 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 나타냈

으며 대사안정성 역시 유사한 수준을 유지하였다. 또한 화합물 **69**는 mouse에서 비교적 우수한 PD 효능 (10 mg/kg 투여 2시간 후 liver와 EPF에서 각각 48%, 81% 11 $\beta$ -HSD1 억제)을 나타냈는데, 이는 pyrimidine-4-carboxamide 구조의 경구용 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor로서의 가능성을 보여주는 것이었다.

**Table 11.** *In vitro* and *ex vivo* data of 4-(methylsulfonyl)phenylpiperazine derivatives



Compd	R	X	HEK293 <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (nM)	MLM MST <sup>b</sup> (%R <sub>30min</sub> )	Mouse PD <sup>c</sup> (%inh. at 2 h)	
					Liver	EPF
<b>47</b>	H	CH	3.9	87	ND <sup>d</sup>	ND
<b>57</b>	Me	CH	3.1	97	70	86
<b>68</b>	H	N	26	96	0	0
<b>69</b>	Me	N	8.5	92	48	81

<sup>a</sup> HEK293 cells stably transfected with human 11 $\beta$ -HSD1 cDNA

<sup>b</sup> Metabolic stability test using mouse liver microsomes

<sup>c</sup> Dosed po at 10 mg/kg, 0.5% MC and 1% Tween80 was used as vehicle

<sup>d</sup> Not determined

위의 결과를 통해 picolinamide 구조와 마찬가지로 pyrimidine-4-carboxamide 구조 역시 piperazine ring에 (*R*)-methyl group을 도입할 경우 cellular potency 및 PD 효능이 증가한다는 사실을 알 수 있었다. 특히 pyrimidine-4-carboxamide 구조에서는 그 증가의 폭이 더욱 컸는데, 이는 picolinamide 구조 대비 pyrimidine-4-carboxamide 구조의 cLogP 값이 매우 낮아 (**47**의 cLogP = 1.81 vs. **68**의 cLogP = 1.22) methyl group 도

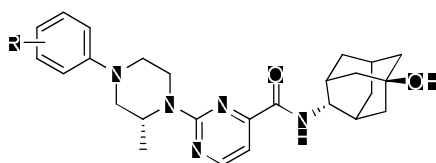
입에 의한 lipophilicity의 증가가 cell permeability 및 경구 흡수율 개선에 미치는 효과가 더욱 컸기 때문으로 추정된다. 한편, picolinamide 화합물 **57**은 10 mg/kg의 낮은 용량을 투여한 PD 시험에서도 매우 우수한 효능 (투여 2시간 후 liver와 EPF에서 각각 70%, 86% 11 $\beta$ -HSD1 억제)을 나타냈으며, 따라서 pyrimidine-4-carboxamide 화합물 **69**가 비교적 우수한 PD 효능을 보여주었음에도 불구하고 추가적인 최적화 연구가 요구되었다.

다음으로 pyrimidine-4-carboxamide 화합물 **69**의 phenyl ring에 치환된 4-methylsulfonyl group을 다른 functional group으로 변형한 유도체 **70-79**에 대한 활성, 대사안정성, ex-vivo PD assay 결과를 Table 12에 나타내었다. 새로운 functional group으로는 기존 picolinamide 유도체에 대한 검색에서 우수한 활성을 확인한 바 있는 4-CN, 4-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH 등을 선정하였으며, picolinamide 대비 pyrimidine-4-carboxamide 구조의 cLogP 값이 낮아 cellular potency 및 PD 효능이 미약할 수 있다는 점을 고려하여 halogen, trifluoromethyl 등의 lipophilic group 역시 포함시켰다. 또한 phenyl ring의 4번 위치에 적절한 functional group을 유지하면서 2번 위치에 halogen, methyl 등을 도입하여 lipophilicity를 보완하는 유도체 역시 합성하여 검색하였다.

Table 12에서 보듯이 phenyl ring의 4번 위치에 새로운 functional group을 도입한 pyrimidine-4-carboxamide 화합물들 (**70-74**)은 모두 비교적 우수한 cellular potency 및 대사안정성을 보여주었다. 그러나 이 화합물들의 IC<sub>50</sub> 값은 10~20 nM 수준으로 화합물 **69** 대비 다소 높았으며, 가장 우수한 활성을 나타낸 화합물 **70**과 **74**에 대한 ex-vivo PD assay 결과 PD 효능 역시 기존 화합물 **57** 또는 **69** 대비 매우 미흡한 것으로 평가되었다. 한편, phenyl ring의 4번 위치에 halogen 또는 trifluoromethyl group을 도입한 화합물들 (**71-73**)의 경우 lipophilicity의 증가에도 불구하고 상대적으로 낮은 cellular potency를 나타냈는데, 이를 통해 phenyl ring의 4번 위치에 hydrogen bond acceptor를 포함한 polar functional group을 도입하는 것이 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성에 유리하다는 기존의 structure-activity relationship이 pyrimidine-4-carboxamide 구조에서도 재 확인되었다.

한편, phenyl ring의 4번 위치에 적절한 functional group (4-OMe, 4-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, 4-SO<sub>2</sub>Me)을 유지하면서 2번 위치에 halogen, methyl 등을 추가로 도입한 화합물들 (75-79)의 경우 대부분 기존의 pyrimidine-4-carboxamide 화합물 대비 개선된 cellular potency를 나타냈으며 (화합물 75를 제외하고 IC<sub>50</sub> 값 10 nM 이하) 대사안정성 역시 매우 우수하였다. (mouse liver microsome에서 30분 후 잔류량 90% 이상) 화합물 76의 경우 fluoro group이 도입되지 않은 화합물 74 대비 cellular potency가 다소 증가했으며 PD assay에서의 효능 역시 상당히 개선되었다.

Phenyl ring의 2번 위치에 fluoro group을 도입함에 따른 강력한 효과는 화합물 77에서 확인할 수 있는데, phenyl ring의 4번 위치만 치환된 pyrimidine-4-carboxamide 화합물 중 가장 우수한 활성을 나타냈던 화합물 69에 2-fluoro group을 추가한 화합물 77은 화합물 69 대비 2배 이상 증가한 cellular potency와 매우 우수한 대사안정성을 보여주었다. (HEK293 IC<sub>50</sub> = 3.9 nM, mouse liver microsome에서 30분 후 잔류량 98%) 또한 ex-vivo PD assay 결과 화합물 77은 10 mg/kg의 용량을 경구 투여한 2시간 후 liver와 EPF에서 11 $\beta$ -HSD1의 활성을 각각 86%, 88% 억제하는 강력한 PD 효능을 나타내었다. 화합물 77의 in-vitro potency 및 대사안정성은 picolinamide 구조에서 가장 우수했던 화합물 57 (HEK293 IC<sub>50</sub> = 3.1 nM, mouse liver microsome에서 30분 후 잔류량 97%)과 유사한 수준이었으며 PD 효능은 화합물 57 보다 더욱 우수하였다. 따라서 화합물 77은 화합물 57 대비 개선된 PK profile을 가질 것으로 추정되었으며, 이러한 cellular potency의 증가와 PK profile의 개선은 2-fluoro group 도입을 통해 화합물 69 대비 적절히 증가된 lipophilicity (69의 cLogP = 1.73 vs. 77의 cLogP = 1.98) 때문인 것으로 예상되었다. 한편, 화합물 69의 lipophilicity를 증가시키기 위해 phenyl ring의 2번 위치에 fluoro 대신 chloro 또는 methyl을 도입한 화합물 (78, 79) 역시 화합물 69 대비 개선된 cellular potency 및 PD 효능을 나타내었다. 그러나 in-vitro potency, 대사안정성, PD 효능 등 모든 측면을 종합적으로 고려할 때 화합물 77이 pyrimidine-4-carboxamide 구조의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor로서 가장 최적화된 화합물로 평가되었다.

**Table 12.** *In vitro* and *ex vivo* data of pyrimidine-4-carboxamide derivatives

Compd	R	HEK293 <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (nM)	MLM MST <sup>b</sup> (%R <sub>30min</sub> )	Mouse PD <sup>c</sup> (%inh. at 2 h)	
				Liver	EPF
<b>70</b>	4-CN	11	86	6	12
<b>71</b>	4-F	22	82	ND <sup>d</sup>	ND
<b>72</b>	4-Cl	21	78	ND	ND
<b>73</b>	4-CF <sub>3</sub>	18	90	ND	ND
<b>74</b>	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	9.2	99	32	46
<b>75</b>	2-F, 4-OMe	12	96	14	69
<b>76</b>	2-F, 4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	8.8	98	43	74
<b>77</b>	2-F, 4-SO <sub>2</sub> Me	3.9	98	86	88
<b>78</b>	2-Cl, 4-SO <sub>2</sub> Me	7.6	96	77	84
<b>79</b>	2-Me, 4-SO <sub>2</sub> Me	8.1	90	54	77

<sup>a</sup> HEK293 cells stably transfected with human 11 $\beta$ -HSD1 cDNA<sup>b</sup> Metabolic stability test using mouse liver microsomes<sup>c</sup> Dosed po at 10 mg/kg, 0.5% MC and 1% Tween80 was used as vehicle<sup>d</sup> Not determined



#### 4. 후보물질 profiling 및 질환모델 시험

기존의 picolinamide 구조를 pyrimidine-4-carboxamide 구조로 변형했음에도 불구하고 우수한 cellular potency 및 대사안정성, 그리고 더욱 개선된 ex-vivo PD 효능을 나타낸 화합물 **77**을 잠재적인 후보물질로 선정하여 추가적인 biological evaluation을 진행하였다. 먼저 human 11 $\beta$ -HSD1에 대해 수행한 enzyme assay 결과 화합물 **77**은 cell-based assay에서와 마찬가지로 우수한 억제 활성 (human 11 $\beta$ -HSD1 IC<sub>50</sub> = 2.9 nM)을 나타냈으며, mouse 11 $\beta$ -HSD1 enzyme에 대해서도 강력한 억제 활성 (mouse 11 $\beta$ -HSD1 IC<sub>50</sub> = 1.6 nM)을 나타내어 mouse를 이용한 다양한 질환모델 시험이 가능함을 보여주었다. 또한 human 11 $\beta$ -HSD2 enzyme에 대한 IC<sub>50</sub> 값이 10  $\mu$ M 이상으로 측정되어 11 $\beta$ -HSD2 대비 11 $\beta$ -HSD1에 대해 1000배 이상의 selectivity를 보유한 것으로 확인되었다. (Table 13)

**Table 13.** *In vitro* inhibition data of compound **77**

Compd	HEK293 IC <sub>50</sub> (nM)	hHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	mHSD1 IC <sub>50</sub> (nM)	hHSD2 IC <sub>50</sub> (nM)
<b>77</b>	3.9	2.9	1.6	> 10000

앞에서 설명했듯이 전임상 후보물질 도출 연구에서 기존의 picolinamide 구조를 pyrimidine-4-carboxamide 구조로 변형한 것은 우수한 효능의 picolinamide 화합물 **57**이 보여주었던 CYP inhibition (CYP3A4 IC<sub>50</sub> = 0.97  $\mu$ M, CYP2C19 IC<sub>50</sub> = 3.7  $\mu$ M) 및 hERG blocking (hERG IC<sub>50</sub> = 4.7  $\mu$ M) 문제 때문이었다. Table 14에서 보듯이 새롭게 도출된 pyrimidine-4-carboxamide 화합물 **77**은 5종의 주요 CYP isozyme에 대해 모두 10  $\mu$ M 이상의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내 약물 상호작용의 가능성이 크게 감소하였으며, hERG channel assay에서도 8.0  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값이 측정되어 화합물 **57** 대비 2배 정도 개선된 hERG profile을 보여주었다. 이는 CYP inhibition 및 hERG blocking을 회피하기 위해 기존 화합물의 pyridine ring을 pyrimidine ring으로 전환함으로써 lipophilicity를

감소시키고 (**57**의 cLogP = 2.33 vs. **77**의 cLogP = 1.98) heterocyclic amine의 basicity 역시 감소시키려고 했던 전략이 작동했기 때문으로 판단된다.

한편, 서론에서 서술한 바와 같이 기존 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor들에서 PXR activation 이슈가 다수 보고되어 있음을 감안하여 화합물 **77**에 대한 PXR activation assay 역시 진행하였다. PXR assay는 강력한 PXR activator로 알려진 rifampicin<sup>40</sup>을 10  $\mu$ M 농도로 처리했을 때의 PXR activity를 100%로 하여 화합물의 PXR activation 정도를 측정하는 방식으로 수행하였는데, 화합물 **77**의 경우 10  $\mu$ M 농도에서도 PXR activity를 전혀 증가시키지 않는 것으로 나타났다. (Table 14) 이상의 결과로부터 화합물 **77**은 적절한 lipophilicity를 통해 우수한 cellular potency를 유지하면서도 CYP 및 hERG inhibition, PXR activation 등의 문제가 없는, 우수한 drug-likeness를 갖는 후보물질로 평가되었다.

**Table 14.** CYP and hERG inhibition and PXR activation data of compound **77**

Compd	CYP <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)					hERG <sup>b</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PXR <sup>c</sup> (% activation at 10 $\mu$ M)
	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4		
<b>77</b>	>10	>10	>10	>10	>10	8.0	0.0

<sup>a</sup> Assays were done in pooled human liver microsomes.

<sup>b</sup> Patch clamp assay was performed using CHO cell stably expressing hERG gene.

<sup>c</sup> Data were expressed as a percent of control where 100% of control is equivalent to the activity achieved with 10  $\mu$ M rifampicin.

앞서 다수 화합물에 대한 1차 검색용으로 진행한 ex-vivo PD assay에서 화합물 **77**은 10 mg/kg 용량을 경구 투여한 2시간 후 매우 우수한 PD 효능을 보여준 바 있다. 화합물 **77**의 PD 효능 수준과 그 지속성을 더욱 면밀하게 평가하기 위하여 화합물 **77**을 다양한 용량으로 mouse에 경구투여하고 투여 2시간 및 6시간 후 liver와 EPF에서의 11 $\beta$ -HSD1 억제 활성을 모두 측정하기로 하였다. 투여 2시간 후의 PD 효능은 화합물 **77**을 1, 3, 10 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 측정하였으며, 투여 6

시간 후의 PD 효능은 화합물 77을 3, 10, 30 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 측정하였다. Table 15에서 보듯이 화합물 77은 시험한 모든 용량에서 매우 우수한 11 $\beta$ -HSD1 억제 효능을 나타냈으며 용량의존성과 효능의 지속성을 명확하게 보여주었다. 즉 화합물 77의 11 $\beta$ -HSD1 억제 정도는 투여 2시간 후와 6시간 후에 거의 차이가 없었으며 3 mg/kg 투여 후 liver, EPF에서 각각 70%, 85% 수준, 10 mg/kg 투여 후 liver, EPF에서 각각 85%, 90% 수준으로 탁월하였다.

화합물 77의 투여 용량 대비 ex-vivo PD 효능은 기존의 picolinamide 화합물 57과 비교할 때 3배 정도 우수한 수준이었다. 화합물 57과 77이 유사한 in-vitro potency를 가짐을 감안할 때 화합물 77은 매우 우수한 PK profile을 가질 것으로 예상되었으며, 실제로 mouse를 이용한 in-vivo PK 시험 결과 화합물 77은 oral bioavailability 및 clearance 등의 측면에서 화합물 57 대비 2배 이상 우수한 PK profile을 나타내었다. ( $F = 96\%$ ,  $CL = 0.42$  L/kg/h) 또한 화합물 77은 rat 및 dog을 이용한 in-vivo PK 시험에서도 낮은 clearance, 높은 exposure, 탁월한 oral bioavailability로 특징지을 수 있는 우수한 PK profile을 보여주었는데, (Table 16) 이처럼 다양한 종에서 모두 우수한 PK profile을 나타냄에 따라 화합물 77의 human에서의 PK profile 역시 유망하다고 판단되었다.

**Table 15.** *Ex vivo* PD data of compound 77

Dose	Ex vivo mouse PD <sup>a</sup> (%inh.)			
	Liver		EPF	
	2 h	6 h	2 h	6 h
30 mg/kg	ND <sup>b</sup>	92	ND	93
10 mg/kg	86	87	88	93
3 mg/kg	74	71	86	84
1 mg/kg	55	ND	82	ND

<sup>a</sup> Dosed po at indicated dose, 0.5% MC and 1% Tween80 was used as vehicle

<sup>b</sup> Not determined

**Table 16.** *In vivo* PK data of compound **77**

Species	iv				po			
	CL (L/kg/h)	$V_{ss}$ (L/kg)	$t_{1/2}$ (h)	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	$C_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$t_{max}$ (h)	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	$F$ (%)
Mouse <sup>a</sup>	0.42	1.1	1.7	2.35	2.21	1.0	11.26	96
Rat <sup>a</sup>	0.93	2.1	1.8	1.12	1.02	1.3	3.39	60
Dog <sup>b</sup>	0.36	2.4	4.7	1.47	1.12	2.1	11.52	98

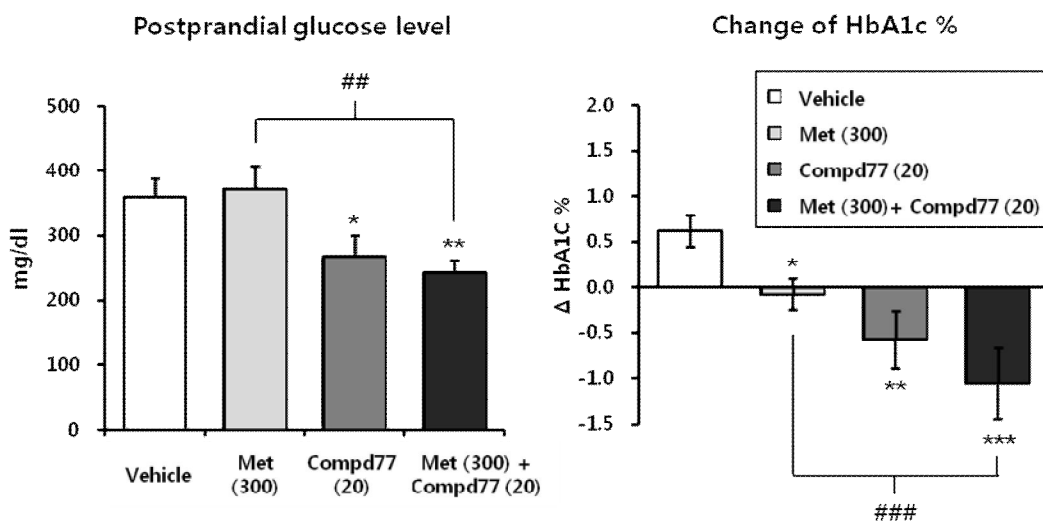
<sup>a</sup> Dosed iv at 1 mg/kg, po at 5 mg/kg<sup>b</sup> Dosed iv at 0.5 mg/kg, po at 4 mg/kg

종합적인 profiling 연구 결과 CYP 및 hERG inhibition, PXR activation의 문제가 없으며 in-vitro potency, PK profile 및 PD 효능이 탁월한 것으로 나타난 화합물 **77**에 대해 *ob/ob* mouse를 이용하여 in-vivo efficacy 평가를 수행하였다. 후보물질 **77**에 대한 *ob/ob* mouse 시험에서는 당뇨병 치료제 개발에 있어 기본적인 임상 지표로 사용되는 당화혈색소 (glycosylated hemoglobin, HbA1c)<sup>41</sup>의 변화를 측정하기 위하여 3주 이상의 장기 투여를 실시하였다. 또한 대부분의 2형 당뇨병 신약의 경우 1차 처방약으로 사용되는 metformin과의 병용이 필수적이라는 점을 고려하여<sup>42</sup> metformin 및 화합물 **77**을 단독 또는 병용으로 투여하여 단독 투여에 의한 효능과 병용 투여에 의한 약효의 증가 여부를 동시에 확인하였다.

Figure 10에서 보듯이 metformin (300 mg/kg) 및 화합물 **77** (20 mg/kg)의 단독 또는 병용투여 군을 설정하여 *ob/ob* mouse에 25일간 1일 1회 경구 투여한 후 비절식 상태에서 혈당을 측정한 결과, metformin 단독투여 군에서는 혈당 강하 효능이 나타나지 않았으나 화합물 **77** 단독투여 군 및 metformin과 화합물 **77**의 병용투여 군에서는 vehicle 군 대비 각각 26%, 33%의 유의적인 혈당 감소를 확인할 수 있었다. 또한 당화혈색소의 변화는 metformin 단독투여 군, 화합물 **77** 단독투여 군, metformin과 화합물 **77**의 병용투여 군에서 각각 -0.70%, -1.20%, -1.67% (vehicle corrected)로 측정되었으며 모든 투여 군에서 유의적인 당화혈색소 감소 효능을 보여주었다. 종합적으로 화합물 **77**은 비절식 상태 혈당 및 당화혈색소, 두 가지 지표에서 모두 우수한 항

당뇨 효능을 나타냈으며, 특히 병용투여 군의 효능이 metformin 또는 화합물 77 단독투여 군 대비 우수하여 metformin과 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor의 병용 투여가 혈당 강화 효능에 있어 시너지 효과가 있음을 보여주었다.

한편, 본 *ob/ob* mouse 시험의 모든 투여 군에 대하여 lipid profile을 분석한 결과 화합물 77 단독투여 군 및 metformin과 화합물 77의 병용투여 군은 LDL cholesterol 및 total cholesterol의 유의적인 감소, triglyceride의 감소 경향성을 보여주었다. 이러한 효능은 화합물 77 단독투여 군과 병용투여 군에서 동등한 수준이며 metformin 단독투여 군 대비 우수하다는 점에서 병용 투여에 의한 lipid profile의 개선 효능은 주로 화합물 77의 효능에 기인한 것으로 판단되었다. (Table 17)



**Figure 10.** Effect of metformin, compound 77, and the combination on glucose levels in *ob/ob* mice. Compounds were orally administrated to *ob/ob* mice at indicated dose (mg/kg) once daily for 25 days. Sterile water containing 0.5% methylcellulose and 1% Tween 80 was used as vehicle. Data were expressed as the means  $\pm$  SE of  $n = 10$ . Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. vehicle, ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs. metformin.

**Table 17.** The effect of metformin, compound **77**, and the combination on lipid profiles in *ob/ob* mice

Group	LDL (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Vehicle	30.3 ± 0.8	286.6 ± 6.3	90.9 ± 5.5
Metformin	23.9 ± 0.9***	252.6 ± 7.4**	99.9 ± 6.3
Compd <b>77</b>	17.1 ± 1.2***	230.6 ± 8.3***	83.4 ± 6.5
Metformin + Compd <b>77</b>	17.2 ± 0.7***	235.0 ± 5.6***	84.1 ± 5.7

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. vehicle

종합적으로, 화합물 **77**은 우수한 in-vitro potency, selectivity, 대사안정성을 기반으로 탁월한 PK profile 및 PD 효능을 보여주었고 질환 동물모델에서 1일 1회 투여에 의한 우수한 혈당 강하 및 lipid profile 개선 효능을 나타냈으며 CYP inhibition, PXR activation, hERG blocking 등에 의한 약물 상호작용 및 심장 독성의 이슈가 없는 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor로 확인되었다. 화합물 **77**은 GLP 독성 시험을 거쳐 임상 시험을 준비하기 위한 전임상 후보물질로 선정되었으며, 향후 2형 당뇨병을 비롯한 고지혈증, 대사 증후군 등의 치료를 위한 신약으로 개발될 것이 기대된다.

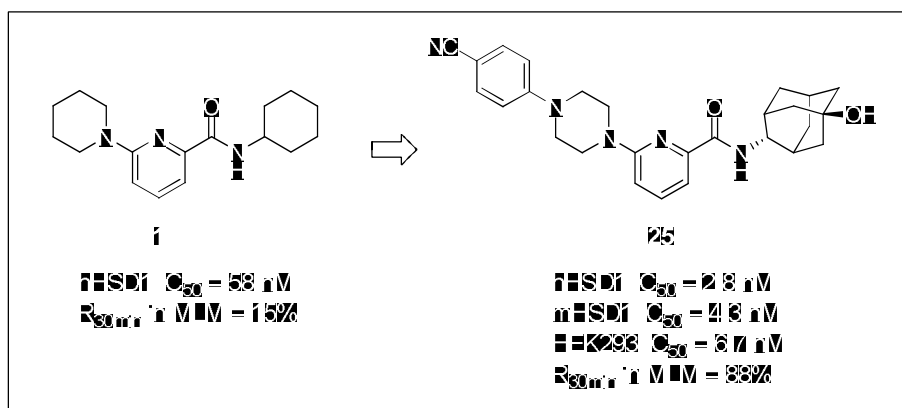
## V. 결 론

본 연구에서는 2형 당뇨 및 대사증후군에 대한 새로운 치료제를 개발할 목적으로 우수한 효능 및 drug-likeness를 보유한 신규의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor를 도출하고자 하였으며 그 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

### 1. 유효물질 최적화 연구

신규 구조의 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor 연구를 시작하기 위해 먼저 library 화합물에 대한 high throughput screening을 수행하여 picolinamide 구조의 유효물질 **1**을 도출하였다. 화합물 **1**과 11 $\beta$ -HSD1과의 docking 연구에 근거하여 in-vitro potency를 개선하고 낮은 대사안정성을 증가시키기 위한 신규 유도체 (cyclohexane ring 변형 유도체 8종, piperidine ring 변형 유도체 16종)를 설계하여 합성하였다.

신규 화합물에 대한 검색 결과, 유효물질 **1**의 cyclohexane ring 대신 hydroxy-adamantyl ring을 도입할 경우 human 11 $\beta$ -HSD1에 대한 억제 활성이 효과적으로 개선되었으며 piperidine ring 대신 phenyl ring의 4번 위치가 치환된 *N*-phenylpiperazine moiety를 도입할 경우 대사안정성이 상당히 증가되었다. Hydroxy-adamantyl ring과 1-(4-cyanophenyl)piperazine이 도입된 화합물 **25**는 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay에서 유효물질 **1** 대비 20배 정도 증가된 활성을 나타냈고 cellular potency 역시 우수하였으며 화합물 **1** 보다 상당히 개선된 대사안정성을 보여주었다.



화합물 **25**는 mouse ex-vivo PD model에 경구 투여했을 때 liver와 fat 조직의 11 $\beta$ -HSD1 활성을 유의적으로 억제하였으며, HF/STZ mouse를 이용한 질환모델 연구 결과 공복혈당 및 혈중 인슐린 수준을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 유효물질 최적화 연구를 통해 도출된 화합물 **25**는 개선된 in-vitro potency 및 대사안정성을 기반으로 ex-vivo PD 및 in-vivo efficacy model에서 유의적인 효능을 보여주었다는 점에서 본 연구의 선도물질로 선정되었다.

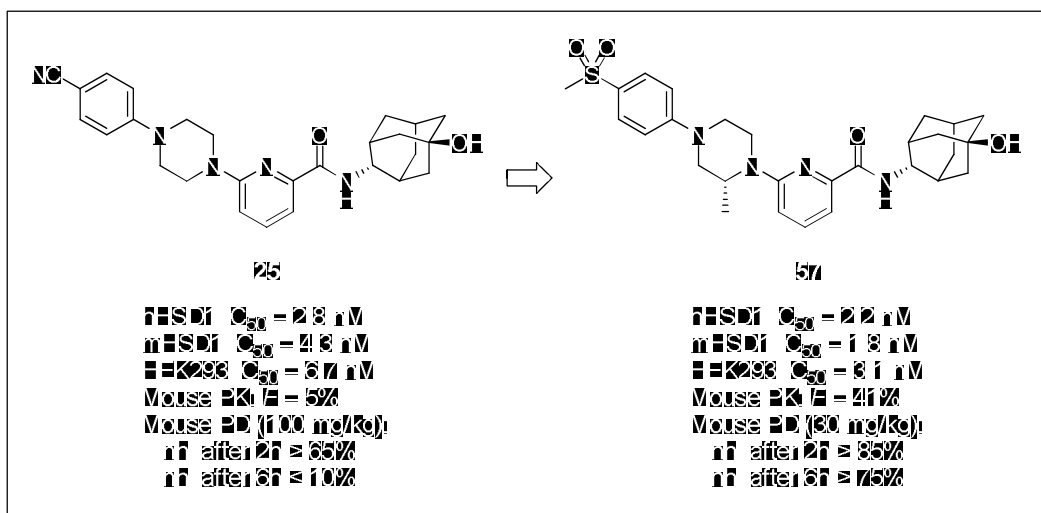
## 2. 선도물질 최적화 연구

선도물질 **25**는 매우 낮은 bioavailability와 큰 clearance 때문에 우수한 PD 효능 및 in-vivo efficacy를 발현하기 위해 비교적 많은 경구투여 용량과 1일 2회 투여가 필요하였다. 따라서 선도물질 **25**에 대한 최적화 연구에 있어 PK profile 개선을 주요 목표로 설정하였으며, 이를 위해 화합물 **25**의 phenyl ring 및 piperazine ring을 유사한 구조로 변형하거나 phenyl ring에 치환된 cyano group을 다른 substituent로 교체한 신규 유도체 27종을 설계하여 합성하였다.

화합물 **25**의 phenyl ring의 4번 위치에 치환된 cyano group을 methylsulfonyl group으로 대체한 결과 enzyme assay 및 cell-based assay에서의 활성이 약 2배 증가하였으며 piperazine ring의 2번 위치에 (*R*)-methyl group을 도입한 결과 cellular potency 및 대사안정성이 추가로 개선되었다. 이렇게 도출된 화합물 **57**은 human 11 $\beta$ -HSD2에 대한 1000배 이상의 selectivity와 mouse 11 $\beta$ -HSD1에 대한 충분한 억제 활성을 보여주었으며 무엇보다도 mouse in-vivo PK 시험에서 선도물질 **25** 대비 상당히 개선된 oral bioavailability 및 clearance를 나타내었다.

PK profile이 개선된 화합물 **57**은 기존 대비 낮은 용량을 투여한 mouse ex-vivo PD 시험에서도 매우 우수한 11 $\beta$ -HSD1 억제 효능을 나타냈으며 그 효능은 투여 6시간 후까지 상당 부분 유지되었다. 또한 *ob/ob* mouse를 이용한 질환모델 연구 결과 1일 1회 경구투여로도 혈당, LDL-cholesterol 및 triglyceride 수준을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타나 우수한 in-vivo efficacy가 확인되었다.





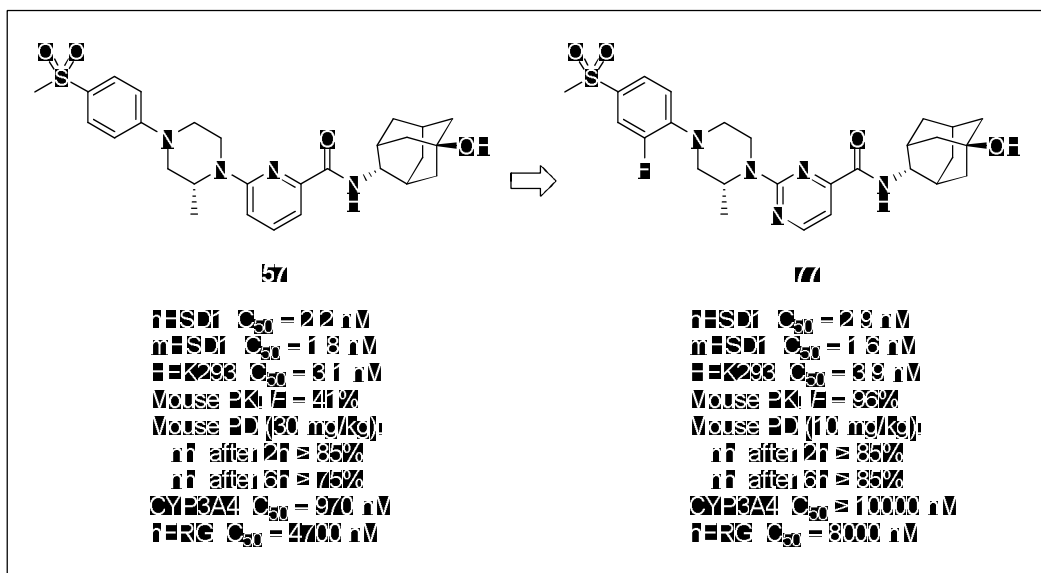
### 3. 전임상 후보물질 도출 연구

화합물 **57**은 선도물질 **25**에 대비하여 in-vitro potency, PK profile, PD 효능이 크게 개선되었으나 비교적 낮은 농도에서 CYP3A4, CYP2C19 및 hERG channel을 억제한다는 문제를 가지고 있었다. 따라서 후보물질 도출을 위한 추가 최적화의 방향성으로서 CYP inhibition 및 hERG blocking을 회피하는 것을 설정하였으며, 이를 위해 분자의 lipophilicity 및 heterocyclic amine의 basicity를 감소시킬 수 있도록 pyrimidine-4-carboxamide 구조의 신규 유도체 12종을 설계하여 합성하였다.

화합물 **57**의 pyridine ring을 pyrimidine ring으로 변형할 경우 cellular potency가 다소 감소하였으나 어느 정도의 PD 효능이 확인되어 pyrimidine-4-carboxamide 구조의 가능성을 확인하였고, 감소된 lipophilicity를 보완하기 위해 phenyl ring의 2번 위치에 fluoro group을 추가로 도입할 경우 cellular potency가 2배 이상 증가하면서 ex-vivo PD 효능 역시 크게 개선되었다. 이렇게 도출된 화합물 **77**은 화합물 **57**과 동등한 수준의 in-vitro potency 및 selectivity를 나타냈으나 CYP inhibition, PXR activation의 문제가 없었으며 hERG profile 역시 개선된 것으로 확인되었다.

화합물 **77**은 mouse in-vivo PK 시험에서 화합물 **57** 대비 2배 이상 개선된 oral bioavailability를 나타냈으며 rat와 dog에서도 우수한 PK profile을 보여주었다. 또한 다양한 경구투여 용량으로 수행한 mouse ex-vivo PD 시험에서 화합물 **57** 대비 3배

정도 개선된 우수하고 지속적인 효능을 나타내었다. *Ob/ob* mouse를 이용한 질환모델 연구 결과 화합물 **77**은 혈당, 당화혈색소, lipid profile을 유의적으로 개선하였으며 metformin과의 병용투여에 의한 효능의 증가 역시 보여주었다.



이상과 같이 저자는 picolinamide 및 pyrimidine-4-carboxamide 구조에 대해 다양한 분자수식을 수행하여 전임상 후보물질로서 적합한 profile을 보유한 11β-HSD1 inhibitor **77**을 도출하였다. 후보물질 **77**은 GLP 독성 시험 및 임상 시험을 거쳐 2형 당뇨병 및 대사 증후군의 치료를 위한 신약으로 개발될 것이 기대된다. 또한 본 연구를 통해 정립된 structure-activity relationship과 화합물의 drug-likeness를 개선하기 위한 방법론들은 향후 신규 11β-HSD1 inhibitor 개발 및 다양한 medicinal chemistry 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

## VI. 실험

### 1. Chemistry

$^1\text{H}$  또는  $^{13}\text{C}$  NMR (nuclear magnetic resonance) spectra는 Varian UNITY 300, JEOL EGA 600 spectrometer를 이용하여 TMS (tetramethylsilane)를 내부 표준물질 (internal standard)로 사용하거나  $\text{CDCl}_3$ 에 잔류해 있는  $\text{CHCl}_3$  (7.26 ppm)를 내부 기준 (internal reference)으로 하여 측정하였으며, chemical shift는 ppm (parts per million)으로, coupling constant는 Hz (hertz)로 나타내었다.

Mass spectra는 ThermoFinnigan LCQ Deca XP plus, Waters SQD2 spectrometer를 사용하여 3.0~3.5 kV의 이온화 전압에서 ESI로 측정하였으며 m/z로 나타내었다.

TLC (thin layer chromatography)는 silica gel (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0.2 mm, Merck)을 사용하였고 column chromatography는 Yamagen의 flash chromatography system과 silica gel (Kieselgel 60, 230-400 mesh, Merck) 또는 Teledyne Isco의 CombiFlash Rf와 RediSep flash column을 사용하였다.

반응에 사용한 용매 중 acetonitrile, 1,2-dichloroethane, dichloromethane, 1,4-dioxane, toluene,  $t\text{BuOH}$ , DMF, THF는 Aldrich의 anhydrous grade를 사용하였고 EtOH, MeOH은 Burdick & Jackson의 HPLC grade를 사용하였다. 반응 용기는 110°C의 dry oven에서 건조하여 사용하였으며 무수 조건의 반응은 질소 ( $\text{N}_2$ ) 기류 하에서 진행하였다. Microwave 반응은 CEM의 Explorer 48 microwave reactor를 사용하여 250 W 출력에서 수행하였다.

### ***N*-Cyclohexyl-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (1)**

**Step 1:** 6-Bromopicolinic acid (500 mg, 2.48 mmol)를 acetonitrile (25 mL)에 현탁시킨 후 cyclohexylamine (0.34 mL, 2.97 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (0.65 mL, 3.72 mmol), HBTU (1.13 g, 2.97 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (30% EtOAc/Hexane)하여 6-bromo-*N*-cyclohexylpicolinamide (624 mg, 94%)를 무색 오일로 수득하였다.

MS (ESI)  $m/z$  = 283  $[M+H]^+$ .

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-cyclohexylpicolinamide (55 mg, 0.194 mmol), piperidine (18 mg, 0.213 mmol),  $Pd_2(dba)_3$  (3.5 mg, 0.00388 mmol), xantphos (6.7 mg, 0.0116 mmol), sodium tert-butoxide (27.4 mg, 0.285 mmol)를 toluene (3 mL)에 현탁시키고 질소기류 하 100°C 상에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (30% EtOAc/Hexane)하여 화합물 **1** (51 mg, 83%)을 미황색 오일로 수득하였다.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 8.28 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (dd,  $J$  = 7.5, 9.0 Hz, 1H), 7.22 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 7.00 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 3.82-3.69 (m, 1H), 3.57-3.54 (m, 4H), 1.81-1.52 (m, 10H), 1.45-1.24 (m, 6H).

MS (ESI)  $m/z$  = 288  $[M+H]^+$ .

### ***N*-((*E*)-4-Hydroxycyclohexyl)-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (2)**

**Step 1:** 6-Bromopicolinic acid (600 mg, 2.97 mmol)를 acetonitrile (20 mL)에 현탁시킨 후 *trans*-4-aminocyclohexanol hydrochloride (500 mg, 2.48 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (1.0 mL, 6.19 mmol), HBTU (1.1 g, 2.97 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 상온에서 13시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (20 mL)를 가한 뒤 MC (40 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (5% MeOH/MC)하여 6-bromo-*N*-((*E*)-4-hydroxycyclohexyl)picolinamide (**29**, 538 mg, 73%)를 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.16 (dd,  $J = 1.2, 7.8$  Hz, 1H), 7.71 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.65 (brs, 1H), 7.60 (dd,  $J = 0.9, 7.8$  Hz, 1H), 3.97-3.91 (m, 1H), 3.73-3.63 (m, 1H), 2.12-2.04 (m, 4H), 1.50-1.41 (m, 4H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-4-hydroxycyclohexyl)picolinamide (**29**, 50 mg, 0.167 mmol)를 acetonitrile (1 mL)에 녹인 후 piperidine (0.13 mL, 1.336 mmol)을 가하고 150°C 에서 2 시간 동안 microwave irradiation 하였다. 반응액을 감압 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (5% MeOH/MC)하여 화합물 **2** (45 mg, 89%)를 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.72 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.47 (dd,  $J = 0.6, 7.2$  Hz, 1H), 6.79 (dd,  $J = 0.6, 8.4$  Hz, 1H), 3.97-3.87 (m, 1H), 3.72-3.63 (m, 1H), 3.53 (brs, 4H), 2.14-2.01 (m, 4H), 1.67 (brs, 6H), 1.55-1.31 (m, 4H). MS (ESI)  $m/z = 304$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### *N*-Cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxycyclohexyl)-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (**3**)

**Step 1:** 1,4-Cyclohexanedione mono-ethylene ketal (1.0 g, 6.4 mmol)을 MeOH (30 mL)에 녹인 후 0°C 상에서 sodium borohydride (750 mg, 19.2 mmol)를 가하고 질소기류 하 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축한 후 염화나트륨 포화수용액 (30 mL)을 가하고 EtOAc (50 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하고 진공 건조하여 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (**26**, R = H, 992 mg, 98%)을 백색 고체로 수득하였다.

**Step 2:** 1,4-Dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (**26**, R = H, 992 mg, 6.27 mmol)을 THF (30 mL)에 녹인 후 1N-HCl 수용액 (15 mL)을 가하고 상온에서 18시간 동안 교반하였다. 반응액에 10% NaOH 수용액을 가하여 중화한 뒤 MC (30 mL x 3)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (60% EtOAc/Hexane)하여 4-hydroxycyclohexanone (450 mg, 62%)을 무색 오일로 수득하였다.

**Step 3:** 4-Hydroxycyclohexanone (443 mg, 3.88 mmol)을 1,2-dichloroethane (20 mL)에 녹인 후 cyclopropylamine (0.295 mL, 4.27 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.3 g, 6.21 mmol), acetic acid (0.2 mL, 3.88 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 상온에서 13시간 동안 교반하였다. 반응액에 10% NaOH 수용액을 가하여 중화한 뒤 10% MeOH/MC (15 mL x 4)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하고 진공 건조하여 4-(cyclopropylamino)cyclohexanol (**27**, R = H, 574 mg, 95%)을 황색 고체로 수득하였다.

**Step 4:** 6-Bromopicolinic acid (48 mg, 0.238 mmol)를 acetonitrile (2 mL)에 현탁시킨 후 4-(cyclopropylamino)cyclohexanol (**27**, R = H, 31 mg, 0.200 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (0.052 mL, 0.300 mmol), HBTU (91 mg, 0.238 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (5 mL)를 가한 뒤 MC (10 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (50% EtOAc/Hexane)하여 6-bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxycyclohexyl)picolinamide (**28**, R = H, *trans*-isomer, 21 mg, 32%) 와 6-bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxycyclohexyl)picolinamide (**28**, R = H, *cis*-isomer, 23 mg, 33%)를 각각 무색 오일로 수득하였다.

*Trans*-isomer: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.63 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.09 (brs, 1H), 3.72-3.60 (m, 1H), 2.82 (brs, 1H), 2.10-1.86 (m, 6H), 1.47-1.40 (m, 2H), 0.53 (brs, 2H), 0.39 (brs, 2H).

*Cis*-isomer: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.63 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.18 (brs, 1H), 4.09 (brs, 1H), 2.82 (brs, 1H), 2.28-2.14 (m, 2H), 1.94-1.77 (m, 6H), 0.55 (brs, 2H), 0.44 (brs, 2H).

**Step 5:** 6-Bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxycyclohexyl)picolinamide (**28**, R = H, *trans*-isomer, 60 mg, 0.177 mmol)를 사용하여 화합물 **2** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **3** (60 mg, 99%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.49 (dd, *J* = 7.2, 8.7 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.09 (brs, 1H), 3.70-3.59 (m, 1H), 3.53-3.48 (m, 4H), 2.72 (brs, 1H), 2.10-1.86 (m, 6H), 1.62 (brs, 6H), 1.49-1.36 (m, 2H), 0.47 (brs, 4H).

MS (ESI)  $m/z = 344$   $[M+H]^+$ .

***N*-Cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxycyclohexyl)-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (4)**

6-Bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxycyclohexyl)picolinamide (**28**, R = H, *cis*-isomer, 60 mg, 0.177 mmol)를 사용하여 화합물 **2** 합성의 *Step 2*와 동일한 방법에 의해 화합물 **4** (57 mg, 94%)를 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.49 (dd,  $J = 7.2, 8.7$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.62 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 4.22 (brs, 1H), 4.07 (brs, 1H), 3.53-3.48 (m, 4H), 2.72 (brs, 1H), 2.28-2.14 (m, 2H), 1.94-1.84 (m, 2H), 1.82-1.50 (m, 10H), 0.50 (brs, 4H).

MS (ESI)  $m/z = 344$   $[M+H]^+$ .

***N*-Cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxy-4-methylcyclohexyl)-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (5)**

**Step 1:** 1,4-Cyclohexanedione mono-ethylene ketal (1.0 g, 6.4 mmol)을 THF (30 mL)에 녹인 후 0°C 상에서 MeMgCl (3.0 M solution in THF, 2.6 mL, 7.7 mmol)를 가하고 질소기류 하 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액을 가한 뒤 MC (50 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (50% EtOAc/Hexane)하여 8-methyl-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (**26**, R = Me, 654 mg, 59%)을 백색 고체로 수득하였다.

**Step 2:** 8-Methyl-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (**26**, R = Me, 650 mg, 3.77 mmol)을 사용하여 화합물 **3** 합성의 *Step 2*와 동일한 방법에 의해 4-hydroxy-4-methylcyclohexanone (443 mg, 92%)을 황색 오일로 수득하였다.

**Step 3:** 4-Hydroxy-4-methylcyclohexanone (440 mg, 3.43 mmol)을 사용하여 화합물 **3** 합성의 *Step 3*와 동일한 방법에 의해 4-(cyclopropylamino)-1-methylcyclohexanol (**27**, R = Me, 504 mg, 87%)을 황색 고체로 수득하였다.

**Step 4:** 6-Bromopicolinic acid (428 mg, 2.12 mmol)와 4-(cyclopropylamino)-1-methylcyclohexanol (**27**, R = Me, 359 mg, 2.12 mmol)을 사용하여 화합물 **3** 합성의 Step 4와 동일한 방법에 의해 6-bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxy-4-methylcyclohexyl)picolinamide (**28**, R = Me, *trans*-isomer, 317 mg, 42%) 와 6-bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxy-4-methylcyclohexyl)picolinamide (**28**, R = Me, *cis*-isomer, 363 mg, 48%)를 각각 백색 고체로 수득하였다.

*Trans*-isomer:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.62 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 4.04 (brs, 1H), 2.84 (brs, 1H), 2.10-1.88 (m, 4H), 1.84-1.77 (m, 2H), 1.65-1.57 (m, 2H), 1.33 (s, 3H), 0.55 (brs, 2H), 0.43 (brs, 2H).

*Cis*-isomer:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.62 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 4.13 (brs, 1H), 2.83 (brs, 1H), 2.25-2.12 (m, 2H), 1.84-1.72 (m, 4H), 1.64-1.52 (m, 2H), 1.26 (s, 3H), 0.55 (brs, 2H), 0.43 (brs, 2H).

**Step 5:** 6-Bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxy-4-methylcyclohexyl)picolinamide (**28**, R = Me, *trans*-isomer, 60 mg, 0.170 mmol)를 사용하여 화합물 **2** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **5** (58 mg, 96%)를 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.49 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.62 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.05 (brs, 1H), 3.53-3.48 (m, 4H), 2.75 (brs, 1H), 2.10-1.75 (m, 6H), 1.62 (brs, 8H), 1.34 (s, 3H), 0.50 (brs, 4H).

MS (ESI)  $m/z = 358$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N*-Cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxy-4-methylcyclohexyl)-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (**6**)**

6-Bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxy-4-methylcyclohexyl)picolinamide (**28**, R = Me, *cis*-isomer, 60 mg, 0.170 mmol)를 사용하여 화합물 **2** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **6** (59 mg, 97%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.49 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.62 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.17 (brs, 1H), 3.55-3.48 (m, 4H), 2.74 (brs, 1H), 2.25-2.11 (m, 2H), 1.81-1.70 (m, 4H), 1.62 (brs, 8H), 1.25 (s, 3H), 0.50 (brs, 4H).



MS (ESI)  $m/z = 358$   $[M+H]^+$ .

***N*-Cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxy-4-(trifluoromethyl)cyclohexyl)-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (7)**

**Step 1:** 1,4-Cyclohexanedione mono-ethylene ketal (1.5 g, 9.6 mmol)을 THF (35 mL)에 녹인 후 0°C 상에서  $\text{TMSCF}_3$  (2.8 mL, 19.2 mmol)와 TBAF (1.0 M solution in THF, 20 mL, 20.0 mmol)를 차례로 가하고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액 (10 mL)을 넣고 10분간 교반한 후 감압 농축하여 얻어진 잔사에 증류수 (10 mL)를 가하고 MC (50 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (40% EtOAc/Hexane)하여 8-(trifluoromethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (**26**,  $R = \text{CF}_3$ , 2.1 g, 97%)을 황색 오일로 수득하였다.

**Step 2:** 8-(Trifluoromethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (**26**,  $R = \text{CF}_3$ , 2.0 g, 8.84 mmol)을 사용하여 화합물 **3** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 4-hydroxy-4-(trifluoromethyl)cyclohexanone (1.24 g, 77%)을 백색 고체로 수득하였다.

**Step 3:** 4-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)cyclohexanone (570 mg, 3.13 mmol)을 사용하여 화합물 **3** 합성의 Step 3와 동일한 방법에 의해 4-(cyclopropylamino)-1-(trifluoromethyl)cyclohexanol (**27**,  $R = \text{CF}_3$ , 650 mg, 93%)을 황색 고체로 수득하였다.

**Step 4:** 6-Bromopicolinic acid (703 mg, 3.48 mmol)와 4-(cyclopropylamino)-1-(trifluoromethyl)cyclohexanol (**27**,  $R = \text{CF}_3$ , 647 mg, 2.90 mmol)을 사용하여 화합물 **3** 합성의 Step 4와 동일한 방법에 의해 6-bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxy-4-(trifluoromethyl)cyclohexyl)picolinamide (**28**,  $R = \text{CF}_3$ , *trans*-isomer, 312 mg, 27%) 와 6-bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxy-4-(trifluoromethyl)cyclohexyl)picolinamide (**28**,  $R = \text{CF}_3$ , *cis*-isomer, 450 mg, 39%)를 각각 백색 고체로 수득하였다.

*Trans*-isomer:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.64 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.54-7.49 (m, 2H), 4.23 (brs, 1H), 2.79 (brs, 1H), 2.34-2.27 (m, 2H), 2.18-1.96 (m, 4H), 1.78-1.69 (m, 2H), 0.57 (brs, 2H), 0.41 (brs, 2H).

*Cis*-isomer:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.64 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.53-7.49 (m, 2H), 4.17 (brs, 1H), 2.85 (brs, 1H), 2.29-2.15 (m, 2H), 1.98-1.76 (m, 6H), 0.57 (brs, 2H), 0.43 (brs, 2H).

**Step 5:** 6-Bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*E*)-4-hydroxy-4-(trifluoromethyl)cyclohexyl)picolinamide (**28**, R =  $\text{CF}_3$ , *trans*-isomer, 60 mg, 0.147 mmol)를 사용하여 화합물 **2** 합성의 *Step* 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **7** (57 mg, 94%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.49 (dd,  $J = 7.2, 8.7$  Hz, 1H), 6.79 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.63 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 4.27 (brs, 1H), 3.53-3.48 (m, 4H), 2.72-2.67 (m, 1H), 2.32-2.23 (m, 2H), 2.21-2.04 (m, 2H), 2.02-1.91 (m, 2H), 1.80-1.55 (m, 8H), 0.56-0.43 (m, 4H).

MS (ESI)  $m/z = 412$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N*-Cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxy-4-(trifluoromethyl)cyclohexyl)-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (**8**)**

6-Bromo-*N*-cyclopropyl-*N*-((*Z*)-4-hydroxy-4-(trifluoromethyl)cyclohexyl)picolinamide (**28**, R =  $\text{CF}_3$ , *cis*-isomer, 60 mg, 0.147 mmol)를 사용하여 화합물 **2** 합성의 *Step* 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **8** (56 mg, 93%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.50 (dd,  $J = 7.5, 8.7$  Hz, 1H), 6.79 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.64 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 4.20 (brs, 1H), 3.53-3.49 (m, 4H), 2.74 (brs, 1H), 2.29-2.15 (m, 2H), 1.96-1.73 (m, 6H), 1.69-1.51 (m, 6H), 0.50 (brs, 4H).

MS (ESI)  $m/z = 412$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (**9**)**

**Step 1:** 6-Bromopicolinic acid (17.5 g, 87 mmol)를 acetonitrile (500 mL)에 현탁시킨 후 *trans*-4-aminoadamantan-1-ol (17.4 g, 104 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (18.1 mL, 104 mmol), HBTU (39.4 g, 104 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 상온에서 15시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축한 후 증류수 (200 mL)를 가하고 10%

MeOH/MC (300 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (70% EtOAc/Hexane)하여 6-bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 26.1 g, 85%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.16 (dd,  $J$  = 0.9, 7.5 Hz, 1H), 8.12 (brs, 1H), 7.72 (dd,  $J$  = 7.5, 7.8 Hz, 1H), 7.62 (dd,  $J$  = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 2.25 (brs, 3H), 1.99-1.88 (m, 3H), 1.86-1.78 (m, 5H), 1.61-1.53 (m, 2H), 1.43 (s, 1H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 50 mg, 0.142 mmol)를 acetonitrile (1 mL)에 녹인 후 piperidine (48 mg, 0.568 mmol), triethylamine (0.04 mL, 0.284 mmol)을 가하고 150°C 에서 2시간 동안 microwave irradiation 하였다. 반응액을 감압 농축한 후 염화암모늄 포화수용액 (10 mL)을 가하고 MC (20 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (4% MeOH/MC)하여 화합물 **9** (42 mg, 82%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.30 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J$  = 7.2, 8.7 Hz, 1H), 7.23 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.07 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 3.95-3.92 (m, 1H), 3.58-3.55 (m, 4H), 2.05 (brs, 3H), 1.77-1.47 (m, 16H).

MS (ESI)  $m/z$  = 356 [M+H]<sup>+</sup>.

### 6-(4-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)piperidin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**10**)

**Step 1:** 1-Benzylpiperidin-4-one (1.0 g, 5.28 mmol)을 THF (20 mL)에 녹인 후 0°C 상에서 TMSCF<sub>3</sub> (1.56 mL, 10.6 mmol)와 TBAF (1.0 M solution in THF, 10.6 mL, 10.6 mmol)를 차례로 적가하고 질소기류 하 상온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액을 가한 뒤 MC (50 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (3% MeOH/MC)하여 1-benzyl-4-(trifluoromethyl)piperidin-4-ol (**31**, R = CF<sub>3</sub>, 1.22 g, 89%)을 미황색 오일로 수득하였다.

**Step 2:** 1-Benzyl-4-(trifluoromethyl)piperidin-4-ol (**31**, R = CF<sub>3</sub>, 350 mg, 1.35 mmol)을 EtOH (5 mL)에 녹인 후 palladium (10 wt. % on activated carbon, 120 mg)을 가하고 수소기류 하 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과, 농축하고 진공 건조하여 4-(trifluoromethyl)piperidin-4-ol (**32**, R = CF<sub>3</sub>, 219 mg, 96%)을 황색 오일로 수득하였다.

**Step 3:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.170 mmol)와 4-(trifluoromethyl)piperidin-4-ol (**32**, R = CF<sub>3</sub>, 116 mg, 0.683 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **10** (16 mg, 21%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.72 (dd, *J* = 7.2, 8.7 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 4.51 (s, 1H), 4.29-4.22 (m, 2H), 3.97-3.91 (m, 1H), 3.21-3.11 (m, 2H), 2.06 (brs, 3H), 1.78-1.63 (m, 12H), 1.52-1.45 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 440 [M+H]<sup>+</sup>.

### 6-(4-Hydroxy-4-methylpiperidin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**11**)

**Step 1:** 1-Benzylpiperidin-4-one (1.0 g, 5.28 mmol)을 THF (25 mL)에 녹인 후 0°C 상에서 MeMgCl (3.0 M solution in THF, 2.1 mL, 6.28 mmol)를 가하고 질소기류 하 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액을 가한 뒤 MC (40 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (7% MeOH/MC)하여 1-benzyl-4-methylpiperidin-4-ol (**31**, R = Me, 791 mg, 73%)을 황색 오일로 수득하였다.

**Step 2:** 1-Benzyl-4-methylpiperidin-4-ol (**31**, R = Me, 760 mg, 3.70 mmol)을 사용하여 화합물 **10** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 4-methylpiperidin-4-ol (**32**, R = Me, 118 mg, 28%)을 황색 오일로 수득하였다.

**Step 3:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 55 mg, 0.157 mmol) 와 4-methylpiperidin-4-ol (**32**, R = Me, 72 mg, 0.628 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **11** (48 mg, 79%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 7.2, 8.7 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.38 (s, 1H), 3.97-3.91 (m, 1H), 3.87-3.80 (m, 2H), 3.44-3.35 (m, 2H), 2.04 (brs, 3H), 1.78-1.63 (m, 8H), 1.55-1.44 (m, 6H), 1.14 (s, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 793 [2M+Na]<sup>+</sup>.

### **6-(4-Cyclopropyl-4-hydroxypiperidin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**12**)**

**Step 1:** 1-Benzylpiperidin-4-one (1.0 g, 5.28 mmol)과 cyclopropylmagnesium bromide (0.5 M solution in THF, 12.6 mL, 6.28 mmol)를 사용하여 화합물 **11** 합성의 Step 1과 동일한 방법에 의해 1-benzyl-4-cyclopropylpiperidin-4-ol (**31**, R = cyclopropyl, 360 mg, 30%)을 황색 오일로 수득하였다.

**Step 2:** 1-Benzyl-4-cyclopropylpiperidin-4-ol (**31**, R = cyclopropyl, 360 mg, 1.56 mmol)을 사용하여 화합물 **10** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 4-cyclopropylpiperidin-4-ol (**32**, R = cyclopropyl, 215 mg, 98%)을 황색 오일로 수득하였다.

**Step 3:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.170 mmol) 와 4-cyclopropylpiperidin-4-ol (**32**, R = cyclopropyl, 96 mg, 0.680 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **12** (31 mg, 46%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.2, 8.7 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.04-3.92 (m, 4H), 3.32-3.23 (m, 2H), 2.05 (brs, 3H), 1.78-1.63 (m, 8H), 1.57-1.46 (m, 6H), 0.89-0.80 (m, 1H), 0.37-0.32 (m, 2H), 0.22-0.16 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 412 [M+H]<sup>+</sup>.

### **6-(4-Hydroxy-4-phenylpiperidin-1-yl)-N-((E)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (13)**

**Step 1:** 1-Benzylpiperidin-4-one (1.0 g, 5.28 mmol)과 phenylmagnesium bromide (1.0 M solution in THF, 7.92 mL, 7.92 mmol)를 사용하여 화합물 **11** 합성의 *Step 1*과 동일한 방법에 의해 1-benzyl-4-phenylpiperidin-4-ol (**31**, R = Ph, 1.0 g, 71%)을 미황색 오일로 수득하였다.

**Step 2:** 1-Benzyl-4-phenylpiperidin-4-ol (**31**, R = Ph, 300 mg, 1.12 mmol)을 사용하여 화합물 **10** 합성의 *Step 2*와 동일한 방법에 의해 4-phenylpiperidin-4-ol (**32**, R = Ph, 181 mg, 91%)을 무색 오일로 수득하였다.

**Step 3:** 6-Bromo-N-((E)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 50 mg, 0.142 mmol)와 4-phenylpiperidin-4-ol (**32**, R = Ph, 101 mg, 0.569 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 *Step 2*와 동일한 방법에 의해 화합물 **13** (44 mg, 69%)을 백색 고체로 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.70 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.49-7.45 (m, 2H), 7.34-7.18 (m, 4H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.24-4.17 (m, 2H), 3.97-3.92 (m, 1H), 3.40-3.31 (m, 2H), 2.04 (brs, 3H), 2.02-1.91 (m, 2H), 1.78-1.62 (m, 10H), 1.52-1.44 (m, 2H). MS (ESI) *m/z* = 448 [M+H]<sup>+</sup>.

### **N-((E)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(hydroxymethyl)piperidin-1-yl)picolinamide (14)**

6-Bromo-N-((E)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 50 mg, 0.142 mmol)와 piperidin-4-ylmethanol (66 mg, 0.569 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 *Step 2*와 동일한 방법에 의해 화합물 **14** (38 mg, 69%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 6.9, 8.7 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.36-4.29 (m, 2H), 4.21-4.16 (m,

1H), 3.54 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 2.98-2.89 (m, 2H), 2.22 (brs, 3H), 1.97-1.76 (m, 12H), 1.58-1.54 (m, 2H), 1.39-1.26 (m, 2H).  
MS (ESI)  $m/z = 386$  [M+H]<sup>+</sup>.

### 6-(4-(2-Amino-2-oxoethyl)piperidin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (15)

**Step 1:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 120 mg, 0.342 mmol)와 methyl 2-(piperidin-4-yl)acetate (269 mg, 1.71 mmol)를 사용하여 화합물 **9** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 methyl 2-(1-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)acetate (**33**, 137 mg, 94%)를 무색 오일로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.36 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.60 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.82 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.32-4.25 (m, 2H), 4.21-4.16 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.98-2.89 (m, 2H), 2.30 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.22 (brs, 3H), 2.16-2.02 (m, 1H), 1.97-1.78 (m, 11H), 1.57-1.54 (m, 2H), 1.40-1.26 (m, 2H).  
MS (ESI)  $m/z = 428$  [M+H]<sup>+</sup>.

**Step 2:** Methyl 2-(1-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)acetate (**33**, 50 mg, 0.117 mmol)를 DMF (1 mL)에 녹인 후 formamide (0.02 mL, 0.526 mmol)를 가하였다. 질소기류 하 100°C 상에서 교반하면서 NaOMe (25% solution in MeOH, 0.03 mL, 0.129 mmol)를 적가하고 2시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (0.1 mL)를 가한 후 감압 농축하고 염화암모늄 포화수용액 (10 mL)을 가한 뒤 MC (15 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (7% MeOH/MC)하여 화합물 **15** (31 mg, 64%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.31 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.26 (brs, 1H), 7.24 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.78 (brs, 1H), 4.51 (s, 1H), 4.30-4.22 (m, 2H), 3.97-3.91 (m, 1H), 2.95-2.86 (m, 2H), 2.09-1.89 (m, 6H), 1.77-1.64 (m, 10H), 1.52-1.46 (m, 2H), 1.22-1.10 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 413$   $[M+H]^+$ .

**2-(1-(6-(((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)acetic acid (16)**

Methyl 2-(1-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)acetate (**33**, 40 mg, 0.094 mmol)를 MeOH (2 mL)에 녹인 후 10% NaOH 수용액 (0.17 mL, 0.468 mmol)을 가하고 상온에서 20시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축한 후 증류수 (5 mL)를 가해 녹이고 0°C 상에서 교반하면서 1N-HCl 수용액을 가해 중화하였다. 석출된 고체를 여과 후 진공 건조하여 화합물 **16** (24 mg, 62%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.30 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J = 7.2, 8.7$  Hz, 1H), 7.24 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 4.50 (brs, 1H), 4.31-4.23 (m, 2H), 3.97-3.91 (m, 1H), 2.96-2.85 (m, 2H), 2.17 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.04 (brs, 3H), 1.98-1.90 (m, 1H), 1.77-1.64 (m, 10H), 1.52-1.45 (m, 2H), 1.26-1.12 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 414$   $[M+H]^+$ .

**6-(4-(3-Amino-3-oxopropyl)piperidin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (17)**

**Step 1:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 78 mg, 0.223 mmol)와 methyl 3-(piperidin-4-yl)propanoate (153 mg, 0.891 mmol)를 사용하여 화합물 **9** 합성의 **Step 2**와 동일한 방법에 의해 methyl 3-(1-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)propanoate (**34**, 95 mg, 71%)를 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.37 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.59 (dd,  $J = 7.5, 8.4$  Hz, 1H), 7.48 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.82 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.32-4.24 (m, 2H), 4.21-4.16 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.93-2.84 (m, 2H), 2.38 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.22 (brs, 3H), 1.98-1.93 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 8H), 1.67-1.51 (m, 6H), 1.34-1.20 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 442$   $[M+H]^+$ .



**Step 2:** Methyl 3-(1-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)propanoate (**34**, 50 mg, 0.113 mmol)를 사용하여 화합물 **15** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **17** (38 mg, 79%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.25 (brs, 1H), 7.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.71 (brs, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.32-4.24 (m, 2H), 3.97-3.91 (m, 1H), 2.91-2.80 (m, 2H), 2.11-2.02 (m, 5H), 1.78-1.63 (m, 10H), 1.53-1.41 (m, 5H), 1.18-1.05 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 427 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3-(1-(6-(((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)propanoic acid (**18**)

Methyl 3-(1-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)propanoate (**34**, 40 mg, 0.091 mmol)를 사용하여 화합물 **16**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **18** (30 mg, 78%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 12.12 (brs, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.2, 8.7 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.32-4.24 (m, 2H), 3.97-3.91 (m, 1H), 2.91-2.80 (m, 2H), 2.25 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.04 (brs, 3H), 1.77-1.63 (m, 10H), 1.56-1.41 (m, 5H), 1.19-1.06 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 428 [M+H]<sup>+</sup>.

### 6-(4-Benzylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**19**)

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 500 mg, 1.42 mmol), 1-benzylpiperazine (0.297 mL, 1.71 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (26 mg, 0.028 mmol), xantphos (49 mg, 0.085 mmol), sodium tert-butoxide (205 mg, 2.14 mmol)를 toluene (20 mL)에 현탁시키고 질소기류 하 100°C 상에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액 (30 mL)을 가하고 MC (40 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트

름으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (5% MeOH/MC)하여 화합물 **19** (217 mg, 34%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.31 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.62 (dd,  $J$  = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.53 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.39-7.26 (m, 5H), 6.81 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.21-4.14 (m, 1H), 3.59-3.55 (m, 6H), 2.60 (dd,  $J$  = 4.8, 5.1 Hz, 4H), 2.21 (brs, 3H), 1.98-1.92 (m, 2H), 1.83-1.75 (m, 6H), 1.59-1.51 (m, 2H), 1.40 (brs, 1H).

MS (ESI)  $m/z$  = 447 [M+H]<sup>+</sup>.

### ***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(pyridin-2-ylmethyl)piperazin-1-yl)picolinamide (**20**)**

**Step 1:** 6-(4-Benzylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**19**, 150 mg, 0.336 mmol)를 MeOH (5 mL)에 녹인 후 palladium (10 wt. % on activated carbon, 50 mg)을 가하고 수소기류 하 상온에서 15시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과한 후 감압 농축하여 얻은 잔사를 재결정 (MC/Et<sub>2</sub>O)하여 *N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)-6-(piperazin-1-yl)picolinamide (114 mg, 95%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 9.11 (brs, 1H), 8.15 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.79 (dd,  $J$  = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.39 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.18 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.50 (s, 1H), 3.98-3.92 (m, 1H), 3.78 (dd,  $J$  = 4.8, 5.1 Hz, 4H), 3.22 (dd,  $J$  = 4.8, 5.1 Hz, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.78-1.64 (m, 8H), 1.50-1.42 (m, 2H).

**Step 2:** *N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(piperazin-1-yl)picolinamide (40 mg, 0.112 mmol)와 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide (31 mg, 0.123 mmol)를 1,2-dichloroethane (2 mL)에 현탁시킨 후 *N,N*-diisopropylethylamine (0.06 mL, 0.336 mmol)을 가하고 질소기류 하 70°C 상에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액 (10 mL)을 가하고 MC (15 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (6% MeOH/MC)하여 화합물 **20** (30 mg, 60%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.60 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 8.54 (dd,  $J = 1.5, 4.8$  Hz, 1H), 8.30 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.63 (dd,  $J = 7.5, 8.4$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J = 4.8, 7.8$  Hz, 1H), 6.82 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.21-4.14 (m, 1H), 3.59 (s, 2H), 3.58 (dd,  $J = 4.8, 5.4$  Hz, 4H), 2.60 (dd,  $J = 4.8, 5.4$  Hz, 4H), 2.22 (brs, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.83-1.75 (m, 6H), 1.59-1.52 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 448$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(pyridin-3-ylmethyl)piperazin-1-yl)picolinamide (21)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(piperazin-1-yl)picolinamide (40 mg, 0.112 mmol)와 3-(bromomethyl)pyridine hydrobromide (31 mg, 0.123 mmol)를 사용하여 화합물 **20** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **21** (36 mg, 72%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.62-8.59 (m, 1H), 8.31 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.69 (dt,  $J = 1.8, 7.8$  Hz, 1H), 7.63 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.46 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.23-7.19 (m, 1H), 6.82 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.20-4.15 (m, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.61 (dd,  $J = 4.8, 5.1$  Hz, 4H), 2.67 (dd,  $J = 4.8, 5.1$  Hz, 4H), 2.24-2.16 (m, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.82-1.75 (m, 6H), 1.60-1.51 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 448$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-phenylpiperazin-1-yl)picolinamide (22)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.171 mmol)와 1-phenylpiperazine (111 mg, 0.684 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **22** (52 mg, 70%)를 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 8.26 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J = 6.9, 8.4$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 7.27-7.21 (m, 2H), 7.17 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.02 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 6.81 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 4.51 (s, 1H), 3.98-3.93 (m, 1H), 3.70 (dd,  $J =$

4.5, 5.4 Hz, 4H), 3.28 (dd,  $J = 4.5, 5.4$  Hz, 4H), 2.08 (brs, 3H), 1.78-1.63 (m, 8H), 1.52-1.45 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 433$   $[M+H]^+$ .

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)picolinamide (23)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.171 mmol)와 1-(pyridin-2-yl)piperazine (112 mg, 0.684 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 *Step* 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **23** (51 mg, 68%)을 황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.27 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.13 (dd,  $J = 1.2, 4.8$  Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.59-7.53 (m, 1H), 7.32 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.67 (dd,  $J = 4.8, 6.9$  Hz, 1H), 4.50 (s, 1H), 3.99-3.93 (m, 1H), 3.66 (s, 8H), 2.12-2.05 (m, 3H), 1.78-1.64 (m, 8H), 1.53-1.46 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 434$   $[M+H]^+$ .

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(4-hydroxyphenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (24)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 50 mg, 0.142 mmol)와 4-(piperazin-1-yl)phenol (101 mg, 0.569 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 *Step* 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **24** (41 mg, 64%)를 황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.87 (s, 1H), 8.26 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.73 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.67 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 4.50 (s, 1H), 3.98-3.92 (m, 1H), 3.68 (dd,  $J = 3.9, 5.1$  Hz, 4H), 3.09 (dd,  $J = 3.9, 5.1$  Hz, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.78-1.63 (m, 8H), 1.52-1.45 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 449$   $[M+H]^+$ .

**6-(4-(4-Cyanophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (25)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.171 mmol)와 4-(piperazin-1-yl)benzonitrile (128 mg, 0.684 mmol)을 사용하여 화합물 **9** 합성의 단계 2와 동일한 방법에 의해 화합물 **25** (66 mg, 84%)를 황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 7.5, 8.4 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.50 (s, 1H), 3.99-3.93 (m, 1H), 3.72 (dd, *J* = 3.9, 5.7 Hz, 4H), 3.53 (dd, *J* = 3.9, 5.7 Hz, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.79-1.65 (m, 8H), 1.52-1.45 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 163.52, 157.99, 153.45, 148.15, 139.60, 133.90, 120.60, 114.52, 111.41, 111.31, 98.80, 65.95, 52.39, 46.31, 45.76, 44.85, 44.51, 34.00, 31.09, 29.65.

MS (ESI) *m/z* = 458 [M+H]<sup>+</sup>.

**6-(4-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (35)**

**Step 1:** 6-Chloronicotinonitrile (1.48 g, 10.7 mmol)을 acetonitrile (5 mL)에 녹인 후 piperazine (920 mg, 10.7 mmol), triethylamine (2.2 mL, 16.1 mmol)을 가하고 150°C에서 2시간 동안 microwave irradiation 하였다. 반응액을 감압 농축한 후 염화암모늄 포화 수용액 (20 mL)을 가하고 MC (30 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (15% MeOH/MC)하여 6-(piperazin-1-yl)nicotinonitrile (**62**, R = 4-CN, A = N, Y = H, 1.47 g, 73%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.41 (dd, *J* = 0.6, 2.4 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 0.6, 9.0 Hz, 1H), 3.65 (dd, *J* = 5.1, 5.4 Hz, 4H), 2.96 (dd, *J* = 5.1, 5.4 Hz, 4H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 130 mg, 0.370 mmol)와 6-(piperazin-1-yl)nicotinonitrile (**62**, R = 4-CN, A = N, Y = H, 104 mg, 0.553

mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **35** (110 mg, 65%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.45 (dd,  $J$  = 0.6, 2.4 Hz, 1H), 8.28 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.71-7.65 (m, 2H), 7.59 (dd,  $J$  = 0.6, 7.2 Hz, 1H), 6.85 (dd,  $J$  = 0.6, 8.4 Hz, 1H), 6.66 (dd,  $J$  = 0.6, 9.0 Hz, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 3.91-3.88 (m, 4H), 3.76-3.72 (m, 4H), 2.24 (brs, 3H), 2.01-1.93 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 6H), 1.64-1.55 (m, 2H), 1.42 (s, 1H).

MS (ESI)  $m/z$  = 459 [M+H]<sup>+</sup>.

### **6-(4-(4-Cyanophenyl)piperidin-1-yl)-N-((E)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (36)**

**Step 1:** Diisopropylamine (4.6 mL, 32.6 mmol)을 THF (35 mL)에 녹인 후 질소기류 하 -78°C 상에서 교반하며 n-BuLi (1.6 M solution in hexane, 20 mL, 32.6 mmol)을 천천히 가하였다. 5분간 교반한 후 *tert*-butoxycarbonyl-4-piperidone (5.0 g, 25.1 mmol)을 THF (25 mL)에 녹여 가하고 10분간 교반하였다. THF (25 mL)에 녹인 *N*-phenyl-bis(trifluoromethanesulfonimide) (9.8 g, 27.6 mmol)를 가하고 30분간 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 올려 2시간 30분 동안 교반한 후 반응액에 NaHCO<sub>3</sub> 포화수용액 (50 mL)을 넣어 반응을 중단시켰다. 5% citric acid 수용액 (50 mL)을 넣고 diethyl ether (200 mL)로 추출하였다. 유기층을 1N-NaOH 수용액 (100 mL x 2), 증류수 (100 mL), 염화나트륨 포화수용액 (100 mL)으로 차례로 씻어주고 무수 황산마그네슘으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (10% EtOAc/Hexane)하여 *tert*-butyl 4-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (4.31 g, 52%)를 황색 오일로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 5.77 (brs, 1H), 4.05 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 2H), 3.63 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 2.47-2.42 (m, 2H), 1.48 (s, 9H).

**Step 2:** *Tert*-butyl 4-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (4.31 g, 13.0 mmol)를 1,4-dioxane (70 mL)에 녹인 후 bis(pinacolato)diboron (3.91 g, 15.4 mmol), KOAc (4.12 g, 42.0 mmol), PdCl<sub>2</sub>dppf (343 mg, 0.42 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 80°C 상에서 6시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (50

mL)를 가한 뒤 MC (80 mL x 3)로 추출하고 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (10% EtOAc/Hexane)하여 *tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**63**, 2.37 g, 59%)를 황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 6.46 (brs, 1H), 3.95 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 3.44 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.23 (brs, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.26 (s, 12H).

**Step 3:** *Tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**63**, 120 mg, 0.388 mmol)를 DMF (3 mL)에 녹인 후 4-bromobenzonitrile (85 mg, 0.466 mmol), PdCl<sub>2</sub>dppf (19 mg, 0.023 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (162 mg, 1.16 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 80°C 상에서 4시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (5 mL)를 가한 뒤 MC로 (10 mL x 3) 추출하고 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (10% EtOAc/Hexane)하여 *tert*-butyl 4-(4-cyanophenyl)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (35 mg, 32%)를 무색 오일로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.19 (brs, 1H), 4.16-4.10 (m, 2H), 3.70-3.62 (m, 2H), 2.53 (brs, 2H), 1.51 (s, 9H).

**Step 4:** *Tert*-butyl 4-(4-cyanophenyl)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (35 mg, 0.123 mmol)를 EtOH (2 mL)에 녹인 후 palladium (10 wt. % on activated carbon, 5 mg)을 가하고 수소기류 하 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과한 후 감압 농축하고 진공 건조하여 *tert*-butyl 4-(4-cyanophenyl)piperidine-1-carboxylate (33 mg, 95%)를 무색 오일로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.23 (brs, 2H), 2.85-2.69 (m, 3H), 1.80-1.86 (m, 2H), 1.67-1.57 (m, 2H), 1.51 (s, 9H).

**Step 5:** *Tert*-butyl 4-(4-cyanophenyl)piperidine-1-carboxylate (33 mg, 0.115 mmol)를 MC (1 mL)에 녹인 후 trifluoroacetic acid (1 mL)를 가하고 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응액에 0°C 상에서 NaHCO<sub>3</sub> 포화수용액을 서서히 가하여 중화하고 5% MeOH/MC (10 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조한 후

여과, 농축하고 진공 건조하여 4-(piperidin-4-yl)benzonitrile (**64**, A = CH, 20 mg, 94%)을 무색 오일로 수득하였다.

MS (ESI)  $m/z$  = 187  $[M+H]^+$ .

**Step 6:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 30 mg, 0.085 mmol), 4-(piperidin-4-yl)benzonitrile (**64**, A = CH, 18 mg, 0.094 mmol),  $Pd_2(dba)_3$  (2 mg, 0.002 mmol), xantphos (3 mg, 0.005 mmol), sodium *tert*-butoxide (12 mg, 0.128 mmol)를 toluene (1 mL)에 녹인 후 질소기류 하 100°C 상에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (3 mL)을 가한 뒤 MC (10 mL x 3)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (3% MeOH/MC)하여 화합물 **36** (23 mg, 60%)을 황색 고체로 수득하였다.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm 8.29 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J$  = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.59 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.52-7.36 (m, 4H), 6.92 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.50-4.42 (m, 2H), 4.23-4.16 (m, 1H), 3.48-3.38 (m, 2H), 2.29-2.09 (m, 7H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.84-1.76 (m, 6H), 1.65-1.53 (m, 3H).

MS (ESI)  $m/z$  = 457  $[M+H]^+$ .

### 6-(4-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**37**)

**Step 1:** *Tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**63**, 120 mg, 0.388 mmol)와 6-bromonicotinonitrile (85 mg, 0.466 mmol)을 사용하여 화합물 **36** 합성의 Step 3와 동일한 방법에 의해 *tert*-butyl 5-cyano-5',6'-dihydro-[2,4'-bipyridine]-1'(2'*H*)-carboxylate (24 mg, 22%)를 미황색 오일로 수득하였다.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm 8.81 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.91 (dd,  $J$  = 2.1, 8.1 Hz, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 6.84-6.82 (m, 1H), 4.20-4.17 (m, 2H), 3.66 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 2.66-2.61 (m, 2H), 1.49 (s, 9H).



**Step 2:** *Tert*-butyl 5-cyano-5',6'-dihydro-[2,4'-bipyridine]-1'-(2'*H*)-carboxylate (24 mg, 0.084 mmol)를 사용하여 화합물 **36** 합성의 *Step 4*와 동일한 방법에 의해 *tert*-butyl 4-(5-cyanopyridin-2-yl)piperidine-1-carboxylate (24 mg, 99%)를 무색 오일로 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.81 (dd,  $J$  = 0.6, 2.1 Hz, 1H), 7.90 (dd,  $J$  = 2.1, 8.1 Hz, 1H), 7.29 (dd,  $J$  = 0.6, 8.1 Hz, 1H), 4.33-4.20 (m, 2H), 2.96-2.78 (m, 3H), 1.95-1.87 (m, 2H), 1.74 (dt,  $J$  = 4.5, 12.3 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H).

**Step 3:** *Tert*-butyl 4-(5-cyanopyridin-2-yl)piperidine-1-carboxylate (24 mg, 0.084 mmol)를 사용하여 화합물 **36** 합성의 *Step 5*와 동일한 방법에 의해 6-(piperidin-4-yl)nicotinonitrile (**64**, A = N, 12 mg, 77%)을 무색 오일로 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.81 (dd,  $J$  = 0.6, 2.1 Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J$  = 2.1, 8.1 Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J$  = 0.6, 8.1 Hz, 1H), 3.26-3.20 (m, 2H), 2.91 (tt,  $J$  = 3.6, 12.0 Hz, 1H), 2.77 (dt,  $J$  = 2.4, 12.3 Hz, 2H), 1.96-1.89 (m, 2H), 1.78-1.65 (m, 2H).

**Step 4:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 20 mg, 0.057 mmol)와 6-(piperidin-4-yl)nicotinonitrile (**64**, A = N, 12 mg, 0.064 mmol)을 사용하여 화합물 **36** 합성의 *Step 6*와 동일한 방법에 의해 화합물 **37** (9 mg, 35%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.82 (dd,  $J$  = 0.6, 2.1 Hz, 1H), 8.36 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.91 (dd,  $J$  = 2.1, 8.1 Hz, 1H), 7.64 (dd,  $J$  = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.52 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J$  = 0.6, 8.1 Hz, 1H), 6.88 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.50-4.42 (m, 2H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.12-3.03 (m, 3H), 2.26-2.15 (m, 3H), 2.11-2.02 (m, 2H), 1.99-1.87 (m, 4H), 1.85-1.76 (m, 6H), 1.60-1.52 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z$  = 458 [M+H]<sup>+</sup>.

### 6-(1-(4-Cyanophenyl)piperidin-4-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**38**)

**Step 1:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 300 mg, 0.854 mmol), *tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**63**, 317 mg, 1.03 mmol), potassium carbonate (236 mg, 1.71 mmol)를

toluene (10 mL)에 현탁시킨 후 EtOH (0.5 mL), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (49 mg, 0.043 mmol)을 가하고 질소기류 하 100°C 상에서 4시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액 (20 mL)을 가한 뒤 MC (50 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (3% MeOH/MC)하여 *tert*-butyl 6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)-5',6'-dihydro-[2,4'-bipyridine]-1'(2'*H*)-carboxylate (347 mg, 90%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 7.5, 8.1 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.62 (brs, 1H), 4.24-4.16 (m, 3H), 3.69 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.70 (brs, 2H), 2.26 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.88-1.79 (m, 6H), 1.63-1.56 (m, 2H), 1.51 (s, 9H).

**Step 2:** *Tert*-butyl 6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)-5',6'-dihydro-[2,4'-bipyridine]-1'(2'*H*)-carboxylate (320 mg, 0.706 mmol)를 EtOH (15 mL)에 녹인 후 palladium (10 wt. % on activated carbon, 200 mg)을 가하고 수소기류 하 상온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과한 후 감압 농축하여 얻은 잔사를 MPLC (5% MeOH/MC)하여 *tert*-butyl 4-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidine-1-carboxylate (305 mg, 95%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 4.32-4.18 (m, 3H), 2.95-2.84 (m, 3H), 2.25 (brs, 3H), 2.00-1.92 (m, 4H), 1.88-1.67 (m, 8H), 1.62-1.54 (m, 2H), 1.49 (s, 9H).

**Step 3:** *Tert*-butyl 4-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)piperidine-1-carboxylate (285 mg, 0.626 mmol)를 MC (4 mL)에 녹인 후 trifluoroacetic acid (4 mL)를 가하고 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축한 후 증류수 (10 mL)를 가하고 MC (15 mL)로 추출하여 불순물을 제거하였다. 수층에 NaHCO<sub>3</sub> 포화수용액을 가해 중화하고 5% MeOH/MC (25 mL x 4)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하고 진공 건조하여 *N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)-6-(piperidin-4-yl)picolinamide (**65**, 186 mg, 84%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.03 (dd, *J* = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 7.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 4.24-4.18 (m, 1H), 3.30-3.24 (m, 2H), 2.93-2.78 (m, 3H), 2.25 (brs, 3H), 2.01-1.92 (m, 4H), 1.89-1.77 (m, 8H), 1.62-1.54 (m, 2H).

**Step 4:** *N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(piperidin-4-yl)picolinamide (**65**, 33 mg, 0.093 mmol), 4-bromobenzonitrile (19 mg, 0.102 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (2 mg, 0.002 mmol), BINAP (3.5 mg, 0.006 mmol), sodium tert-butoxide (13 mg, 0.140 mmol)를 toluene (2 mL)에 현탁시키고 질소기류 하 80°C 상에서 4시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (10 mL)를 가한 뒤 MC (15 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (3% MeOH/MC)하여 화합물 **38** (31 mg, 73%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.06 (dd, *J* = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.33 (dd, *J* = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.24-4.17 (m, 1H), 4.06-3.98 (m, 2H), 3.14-2.98 (m, 3H), 2.25-2.16 (m, 3H), 2.13-1.92 (m, 6H), 1.85-1.73 (m, 6H), 1.61-1.51 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 457 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **6-(1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**39**)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(piperidin-4-yl)picolinamide (**65**, 40 mg, 0.113 mmol), 6-chloronicotinonitrile (19 mg, 0.135 mmol)을 acetonitrile (1 mL)에 녹인 후 triethylamine (0.03 mL, 0.226 mmol)을 가하고 질소기류 하 100°C 상에서 5시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액 (10 mL)을 가한 뒤 MC (15 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (3% MeOH/MC)하여 화합물 **39** (42 mg, 82%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.43 (dd, *J* = 0.9, 2.4 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J* = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 7.80 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 0.9, 7.8 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 0.9, 9.0 Hz, 1H), 4.64-4.55 (m, 2H),

4.23-4.16 (m, 1H), 3.19-3.03 (m, 3H), 2.24-2.07 (m, 5H), 1.99-1.72 (m, 10H), 1.59-1.51 (m, 2H), 1.40 (s, 1H).

MS (ESI)  $m/z$  = 458  $[M+H]^+$ .

### **6-(4-(4-Fluorophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (40)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.171 mmol), 1-(4-fluorophenyl)piperazine (37 mg, 0.205 mmol),  $Pd_2(dba)_3$  (3.1 mg, 0.003 mmol), xantphos (5.9 mg, 0.010 mmol), sodium tert-butoxide (25 mg, 0.257 mmol)를 toluene (3 mL)에 현탁시키고 질소기류 하 100°C 상에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (10 mL)을 가한 뒤 MC (15 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (3% MeOH/MC)하여 화합물 **40** (24 mg, 32%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.25 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J$  = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.33 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.17 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.10-7.03 (m, 4H), 4.50 (s, 1H), 3.98-3.92 (m, 1H), 3.70 (dd,  $J$  = 4.5, 5.4 Hz, 4H), 3.22 (dd,  $J$  = 4.5, 5.4 Hz, 4H), 2.08 (brs, 3H), 1.79-1.63 (m, 8H), 1.52-1.45 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z$  = 451  $[M+H]^+$ .

### **6-(4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (41)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.171 mmol)와 1-(4-chlorophenyl)piperazine (40 mg, 0.205 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **41** (67 mg, 84%)을 미황색 고체로 수득하였다.

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.25 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J$  = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.33 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.26 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 7.16 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.03 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 4.49 (s, 1H), 3.99-3.93 (m, 1H), 3.70 (dd,  $J$  = 4.8, 5.1 Hz, 4H), 3.30 (dd,  $J$  = 4.8, 5.1 Hz, 4H), 2.08 (brs, 3H), 1.79-1.64 (m, 8H), 1.53-1.45 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 467$   $[M+H]^+$ .

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (42)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 50 mg, 0.142 mmol)와 1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine (39 mg, 0.171 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **42** (32 mg, 45%)를 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.30 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J = 7.2$ , 8.4 Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.00 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.23-4.17 (m, 1H), 3.77 (dd,  $J = 5.1$ , 5.4 Hz, 4H), 3.47 (dd,  $J = 5.1$ , 5.4 Hz, 4H), 2.25 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.86-1.79 (m, 6H), 1.63-1.54 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 501$   $[M+H]^+$ .

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(*p*-tolyl)piperazin-1-yl)picolinamide (43)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.171 mmol)와 1-(*p*-tolyl)piperazine (36 mg, 0.205 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **43** (20 mg, 26%)을 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.33 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J = 7.2$ , 8.1 Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.12 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.89 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 4.23-4.17 (m, 1H), 3.73 (dd,  $J = 4.8$ , 5.4 Hz, 4H), 3.29 (dd,  $J = 4.8$ , 5.4 Hz, 4H), 2.29 (s, 3H), 2.25 (brs, 3H), 2.00-1.92 (m, 2H), 1.88-1.79 (m, 6H), 1.62-1.55 (m, 2H), 1.40 (s, 1H).

MS (ESI)  $m/z = 447$   $[M+H]^+$ .

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (44)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.171 mmol)와 1-(4-methoxyphenyl)piperazine (39 mg, 0.205 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **44** (19 mg, 24%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 4.50 (s, 1H), 3.98-3.92 (m, 1H), 3.71-3.66 (m, 7H), 3.14 (dd, *J* = 4.8, 5.4 Hz, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.79-1.63 (m, 8H), 1.52-1.45 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 463 [M+H]<sup>+</sup>.

#### ***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (**45**)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 120 mg, 0.342 mmol)와 1-(4-nitrophenyl)piperazine (84 mg, 0.405 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **45** (73 mg, 44%)를 황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 7.75 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 4.50 (s, 1H), 3.99-3.93 (m, 1H), 3.75-3.72 (m, 4H), 3.69-3.66 (m, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.80-1.64 (m, 8H), 1.52-1.45 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 478 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **6-(4-(4-Aminophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**46**)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (**45**, 40 mg, 0.084 mmol)를 10% MeOH/MC (2 mL)에 녹인 후 palladium (10 wt. % on activated carbon, 2 mg)을 가하고 수소기류 하 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과한 후 감압, 농축하여 얻은 잔사를 MPLC (100% EtOAc)하여 화합물 **46** (28 mg, 75%)을 황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.51 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.61 (brs, 2H), 4.49 (s, 1H), 3.98-3.92 (m, 1H), 3.66 (dd, *J* = 3.9, 5.1 Hz, 4H), 3.03 (dd, *J* = 3.9, 5.1 Hz, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.79-1.63 (m, 8H), 1.53-1.45 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 448 [M+H]<sup>+</sup>.

### ***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-(4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (47)**

6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 60 mg, 0.171 mmol)와 1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine (49 mg, 0.205 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **47** (34 mg, 39%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.70 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 3.80 (dd, *J* = 5.1, 5.4 Hz, 4H), 3.58 (dd, *J* = 5.1, 5.4 Hz, 4H), 3.03 (s, 3H), 2.25 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.86-1.79 (m, 6H), 1.64-1.56 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 163.53, 158.03, 154.09, 148.15, 139.61, 129.12, 129.06, 114.11, 111.43, 111.34, 65.95, 52.39, 46.66, 45.77, 44.85, 44.81, 44.57, 34.00, 31.10, 29.65.

MS (ESI) *m/z* = 511 [M+H]<sup>+</sup>.

### **6-(4-(4-Carbamoylphenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (48)**

6-(4-(4-Cyanophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**25**, 53 mg, 0.116 mmol)를 EtOH (0.53 mL)에 현탁시킨 후 1N-NaOH 수용액 (0.46 mL, 0.463 mmol), hydrogen peroxide (30% solution in water, 0.024 mL, 0.232mmol)를 가하고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축한 후 1N-HCl 수용액을 가

해 중화하고 MC (15 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (10% MeOH/MC)하여 화합물 **48** (32 mg, 58%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.79-7.71 (m, 4H), 7.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.03 (brs, 1H), 7.01 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.51 (s, 1H), 3.99-3.92 (m, 1H), 3.71 (dd, *J* = 4.5, 5.7 Hz, 4H), 3.43 (dd, *J* = 4.5, 5.7 Hz, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.79-1.64 (m, 8H), 1.53-1.45 (m, 2H).

MS (ESI) *m/z* = 973 [2M+Na]<sup>+</sup>.

### 6-(4-(4-Cyano-3-fluorophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**49**)

**Step 1:** 4-Bromo-2-fluorobenzonitrile (500 mg, 2.50 mmol), piperazine (646 mg, 7.50 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (46 mg, 0.050 mmol), BINAP (93 mg, 0.150 mmol), sodium tert-butoxide (360 mg, 3.75 mmol)를 toluene (10 mL)에 현탁시키고 질소기류 하 80°C 상에서 15시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (20 mL)을 가한 뒤 MC (30 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (10% MeOH/MC)하여 2-fluoro-4-(piperazin-1-yl)benzonitrile (**62**, R = 3-F-4-CN, A = CH, Y = H, 280 mg, 55%)을 미황색 오일로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.40 (dd, *J* = 7.8, 9.0 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 2.4, 10.8 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 4.8, 5.1 Hz, 4H), 3.00 (dd, *J* = 4.8, 5.1 Hz, 4H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 200 mg, 0.569 mmol)와 2-fluoro-4-(piperazin-1-yl)benzonitrile (**62**, R = 3-F-4-CN, A = CH, Y = H, 140 mg, 0.682 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **49** (107 mg, 40%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 8.1, 8.7 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 2.4, 14.4 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 2.4, 8.7 Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 3.99-



3.92 (m, 1H), 3.73-3.68 (m, 4H), 3.61-3.56 (m, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.79-1.64 (m, 8H), 1.53-1.45 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 476$   $[M+H]^+$ .

### **6-(4-(4-Carbamoyl-3-fluorophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (50)**

6-(4-(4-Cyano-3-fluorophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**49**, 75 mg, 0.158 mmol)를 사용하여 화합물 **48**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **50** (72 mg, 92%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.25 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.64 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.34 (brs, 1H), 7.33 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.22 (brs, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.88-6.78 (m, 2H), 4.50 (s, 1H), 3.99-3.92 (m, 1H), 3.70 (dd,  $J = 5.1, 5.7$  Hz, 4H), 3.47 (dd,  $J = 5.1, 5.7$  Hz, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.80-1.64 (m, 8H), 1.53-1.45 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z = 494$   $[M+H]^+$ .

### **6-(4-(2-Chloro-4-cyanophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (51)**

**Step 1:** 4-Bromo-3-chlorobenzonitrile (250 mg, 1.16 mmol)을 사용하여 화합물 **49** 합성의 **Step 1**과 동일한 방법에 의해 3-chloro-4-(piperazin-1-yl)benzonitrile (**62**, R = 2-Cl-4-CN, A = CH, Y = H, 151 mg, 59%)을 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.62 (d,  $J = 1.8$ , Hz, 1H), 7.50 (dd,  $J = 1.8, 8.7$  Hz, 1H), 7.03 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 3.14-3.10 (m, 4H), 3.08-3.04 (m, 4H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 197 mg, 0.560 mmol)와 3-chloro-4-(piperazin-1-yl)benzonitrile (**62**, R = 2-Cl-4-CN, A = CH, Y = H, 149 mg, 0.672 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **51** (201 mg, 73%)을 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.22 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.99 (d,  $J$  = 2.1, Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J$  = 2.1, 8.7 Hz, 1H), 7.75 (dd,  $J$  = 7.5, 8.4 Hz, 1H), 7.34 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 7.31 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.16 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 3.98-3.91 (m, 1H), 3.73 (dd,  $J$  = 3.9, 5.1 Hz, 4H), 3.25 (dd,  $J$  = 3.9, 5.1 Hz, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.78-1.62 (m, 8H), 1.51-1.44 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z$  = 492  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### **6-(4-(4-Carbamoyl-2-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (52)**

6-(4-(4-Cyano-2-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**51**, 154 mg, 0.313 mmol)를 사용하여 화합물 **48**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **52** (96 mg, 60%)를 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.23 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.97 (brs, 1H), 7.95 (d,  $J$  = 2.1, Hz, 1H), 7.83 (dd,  $J$  = 2.1, 8.4 Hz, 1H), 7.75 (dd,  $J$  = 7.5, 8.4 Hz, 1H), 7.36 (brs, 1H), 7.34 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 7.24 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.16 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 3.98-3.91 (m, 1H), 3.73 (brs, 4H), 3.19 (brs, 4H), 2.07 (brs, 3H), 1.78-1.62 (m, 8H), 1.52-1.44 (m, 2H).

MS (ESI)  $m/z$  = 510  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### **6-((*R*)-4-(4-Cyanophenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (53)**

**Step 1:** 4-Bromobenzonitrile (200 mg, 1.10 mmol)과 (*R*)-2-methylpiperazine (121 mg, 1.21 mmol)을 사용하여 화합물 **49** 합성의 **Step 1**과 동일한 방법에 의해 (*R*)-4-(3-methylpiperazin-1-yl)benzonitrile (**62**, R = 4-CN, A = CH, Y = Me, 152 mg, 69%)을 미황색 오일로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.49 (d,  $J$  = 9.0, Hz, 2H), 6.86 (d,  $J$  = 9.0, Hz, 2H), 3.69-3.62 (m, 2H), 3.16-3.10 (m, 1H), 3.02-2.80 (m, 3H), 2.48 (dd,  $J$  = 10.2, 12.0 Hz, 1H), 1.15 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 80 mg, 0.228 mmol) 와 (*R*)-4-(3-methylpiperazin-1-yl)benzonitrile (**62**, R = 4-CN, A = CH, Y = Me, 55 mg, 0.273 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **53** (20 mg, 19%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.2, 8.1 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.58-4.52 (m, 1H), 4.24-4.17 (m, 1H), 4.08-4.00 (m, 1H), 3.88-3.81 (m, 1H), 3.74-3.68 (m, 1H), 3.59-3.43 (m, 2H), 3.32-3.23 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.86-1.78 (m, 6H), 1.63-1.51 (m, 2H), 1.32 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 472 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **6-((*S*)-4-(4-Cyanophenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**54**)**

**Step 1:** 4-Bromobenzonitrile (200 mg, 1.10 mmol)과 (*S*)-2-methylpiperazine (121 mg, 1.21 mmol)을 사용하여 화합물 **49** 합성의 *Step 1*과 동일한 방법에 의해 (*S*)-4-(3-methylpiperazin-1-yl)benzonitrile (**62**, R = 4-CN, A = CH, Y = Me, 147 mg, 67%)을 미황색 오일로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.49 (d, *J* = 9.0, Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 9.0, Hz, 2H), 3.69-3.62 (m, 2H), 3.16-3.10 (m, 1H), 3.02-2.80 (m, 3H), 2.48 (dd, *J* = 10.2, 12.0 Hz, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 80 mg, 0.228 mmol) 와 (*S*)-4-(3-methylpiperazin-1-yl)benzonitrile (**62**, R = 4-CN, A = CH, Y = Me, 55 mg, 0.273 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **54** (26 mg, 24%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.2, 8.1 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.58-4.52 (m, 1H), 4.24-4.17 (m, 1H), 4.08-4.00 (m, 1H), 3.88-3.81 (m,

1H), 3.74-3.68 (m, 1H), 3.59-3.43 (m, 2H), 3.32-3.23 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.86-1.78 (m, 6H), 1.63-1.51 (m, 2H), 1.32 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z = 472$   $[M+H]^+$ .

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-4-(4-methoxyphenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)picolinamide (**55**)**

**Step 1:** 1-Bromo-4-methoxybenzene (0.25 mL, 2.00 mmol)과 (*R*)-2-methylpiperazine (200 mg, 2.00 mmol)을 사용하여 화합물 **49** 합성의 *Step 1*과 동일한 방법에 의해 (*R*)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methylpiperazine (**62**, R = 4-OMe, A = CH, Y = Me, 122 mg, 30%)을 황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 6.92-6.82 (m, 4H), 3.77 (s, 3H), 3.40-3.34 (m, 2H), 3.11-2.96 (m, 3H), 2.69-2.60 (m, 1H), 2.29 (dd,  $J = 10.2, 11.7$  Hz, 1H), 1.12 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 100 mg, 0.285 mmol)와 (*R*)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methylpiperazine (**62**, R = 4-OMe, A = CH, Y = Me, 70 mg, 0.342 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **55** (46 mg, 34%)를 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.38 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.64 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.98-6.84 (m, 4H), 6.82 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.60-4.52 (m, 1H), 4.22-4.17 (m, 1H), 4.11-4.04 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.59-3.51 (m, 1H), 3.44-3.33 (m, 2H), 3.04 (dd,  $J = 3.3, 11.7$  Hz, 1H), 2.87 (dt,  $J = 3.3, 11.7$  Hz, 1H), 2.24 (brs, 3H), 2.00-1.92 (m, 2H), 1.88-1.77 (m, 6H), 1.63-1.52 (m, 2H), 1.36 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z = 477$   $[M+H]^+$ .

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*S*)-4-(4-methoxyphenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)picolinamide (**56**)**

**Step 1:** 1-Bromo-4-methoxybenzene (0.25 mL, 2.00 mmol)과 (*S*)-2-methylpiperazine (200 mg, 2.00 mmol)을 사용하여 화합물 **49** 합성의 *Step 1*과 동일한 방법에 의해 (*S*)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methylpiperazine (**62**, R = 4-OMe, A = CH, Y = Me, 142 mg, 35%)을 황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 6.92-6.82 (m, 4H), 3.77 (s, 3H), 3.40-3.34 (m, 2H), 3.11-2.96 (m, 3H), 2.69-2.60 (m, 1H), 2.29 (dd, *J* = 10.2, 11.7 Hz, 1H), 1.12 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 100 mg, 0.285 mmol)와 (*S*)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methylpiperazine (**62**, R = 4-OMe, A = CH, Y = Me, 70 mg, 0.342 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **56** (43 mg, 32%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.38 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.98-6.84 (m, 4H), 6.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.60-4.52 (m, 1H), 4.22-4.17 (m, 1H), 4.11-4.04 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.59-3.51 (m, 1H), 3.44-3.33 (m, 2H), 3.04 (dd, *J* = 3.3, 11.7 Hz, 1H), 2.87 (dt, *J* = 3.3, 11.7 Hz, 1H), 2.24 (brs, 3H), 2.00-1.92 (m, 2H), 1.88-1.77 (m, 6H), 1.63-1.52 (m, 2H), 1.36 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 477 [M+H]<sup>+</sup>.

### ***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-2-methyl-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (**57**)**

**Step 1:** 1-Bromo-4-(methylsulfonyl)benzene (300 mg, 1.28 mmol)과 (*R*)-2-methylpiperazine (141 mg, 1.40 mmol)을 사용하여 화합물 **49** 합성의 *Step 1*과 동일한 방법에 의해 (*R*)-3-methyl-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine (**62**, R = 4-SO<sub>2</sub>Me, A = CH, Y = Me, 92 mg, 28%)을 황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.76 (d, *J* = 9.0, Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 9.0, Hz, 2H), 3.73-3.66 (m, 2H), 3.17-3.11 (m, 1H), 3.03-2.83 (m, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.51 (dd, *J* = 10.5, 12.0 Hz, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 80 mg, 0.228 mmol) 와 (*R*)-3-methyl-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine (**62**, R = 4-SO<sub>2</sub>Me, A = CH, Y = Me, 69 mg, 0.273 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **57** (24 mg, 20%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.67 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.59-4.53 (m, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 4.09-4.01 (m, 1H), 3.78-3.73 (m, 1H), 3.60-3.46 (m, 2H), 3.35-3.27 (m, 1H), 3.03 (s, 3H), 2.24 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.86-1.78 (m, 6H), 1.63-1.55 (m, 2H), 1.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 163.95, 156.62, 154.27, 148.34, 139.05, 129.39, 128.59, 113.23, 111.77, 109.84, 67.51, 51.92, 51.35, 48.87, 46.82, 45.29, 45.09, 44.49, 39.98, 34.14, 30.99, 29.84, 15.68.

MS (ESI) *m/z* = 525 [M+H]<sup>+</sup>.

### ***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*S*)-2-methyl-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (**58**)**

**Step 1:** 1-Bromo-4-(methylsulfonyl)benzene (300 mg, 1.28 mmol)과 (*S*)-2-methylpiperazine (141 mg, 1.40 mmol)을 사용하여 화합물 **49** 합성의 *Step 1*과 동일한 방법에 의해 (*S*)-3-methyl-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine (**62**, R = 4-SO<sub>2</sub>Me, A = CH, Y = Me, 176 mg, 54%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.76 (d, *J* = 9.0, Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 9.0, Hz, 2H), 3.73-3.66 (m, 2H), 3.17-3.11 (m, 1H), 3.03-2.83 (m, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.51 (dd, *J* = 10.5, 12.0 Hz, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H).

**Step 2:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 80 mg, 0.228 mmol) 와 (*S*)-3-methyl-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine (**62**, R = 4-SO<sub>2</sub>Me, A = CH, Y = Me, 69 mg, 0.273 mmol)을 사용하여 화합물 **40**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **58** (29 mg, 24%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.67 (dd, *J* = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.59-4.53 (m, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 4.09-4.01 (m, 1H), 3.78-3.73 (m, 1H), 3.60-3.46 (m, 2H), 3.35-3.27 (m, 1H), 3.03 (s, 3H), 2.24 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.86-1.78 (m, 6H), 1.63-1.55 (m, 2H), 1.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 525 [M+H]<sup>+</sup>.

### 6-((*R*)-4-(4-Carbamoylphenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (59)

**Step 1:** 6-Bromo-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**30**, 1.0 g, 2.85 mmol), (*R*)-*tert*-butyl 3-methylpiperazine-1-carboxylate (855 mg, 4.27 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (52 mg, 0.057 mmol), xantphos (99 mg, 0.171 mmol), sodium *tert*-butoxide (410 mg, 4.27 mmol)를 toluene (20 mL)에 현탁시키고 질소기류 하 100°C 상에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액 (20 mL)을 가한 뒤 MC (40 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (90% EtOAc/Hexane)하여 (*R*)-*tert*-butyl 4-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methylpiperazine-1-carboxylate (720 mg, 54%)를 미황색 고체로 수득하였다.

**Step 2:** (*R*)-*Tert*-butyl 4-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methylpiperazine-1-carboxylate (715 mg, 1.52 mmol)를 MC (10 mL)에 녹인 후 trifluoroacetic acid (10 mL)를 가하고 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (30 mL)를 가한 뒤 MC (15 mL x 2)로 추출하였다. 수층에 5N-NaOH 수용액을 가해 중화하고 5% MeOH/MC (40 mL x 3)로 추출한 뒤 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하고 진공 건조하여 *N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)picolinamide (**66**, 516 mg, 92%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 7.2, 8.7 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.44-4.37 (m, 1H), 4.22-4.15 (m,

1H), 3.95-3.88 (m, 1H), 3.19-3.08 (m, 3H), 3.00-2.89 (m, 2H), 2.23 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 6H), 1.62-1.52 (m, 2H), 1.26 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z = 371$   $[M+H]^+$ .

**Step 3:** *N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)picolinamide (**66**, 200 mg, 0.540 mmol), methyl 4-bromobenzoate (174 mg, 0.810 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (5 mg, 0.022 mmol), xantphos (19 mg, 0.032 mmol), cesium carbonate (264 mg, 0.810 mmol)를 toluene (20 mL)에 현탁시키고 질소기류 하 90°C 상에서 15시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (100% EtOAc)하여 methyl 4-((*R*)-4-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methylpiperazin-1-yl)benzoate (**67**, 161 mg, 59%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.35 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.66 (dd,  $J = 7.2, 8.4$  Hz, 1H), 7.55 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.80 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.59-4.52 (m, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 4.08-4.01 (m, 1H), 3.90-3.82 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.77-3.71 (m, 1H), 3.57-3.46 (m, 1H), 3.44-3.38 (m, 1H), 3.29-3.19 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.87-1.79 (m, 6H), 1.63-1.55 (m, 2H), 1.33 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z = 505$   $[M+H]^+$ .

**Step 4:** 4-((*R*)-4-(6-(((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methylpiperazin-1-yl)benzoate (**67**, 100 mg, 0.198 mmol)를 DMF (2 mL)에 녹인 후 formamide (0.035 mL, 0.892 mmol)를 가하고 100°C로 승온하였다. NaOMe (25 wt% solution in MeOH, 0.050 mL, 0.218 mmol)를 가하고 100°C 상에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (0.2 mL)를 가하고 감압 농축한 후 염화암모늄 포화수용액 (20 mL)을 가한 뒤 MC (30 mL x 2)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (10% MeOH/MC)하여 화합물 **59** (43 mg, 44%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.31 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.77 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.73 (dd,  $J = 7.5, 8.7$  Hz, 1H), 7.70 (brs, 1H), 7.29 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.98 (brs, 1H), 6.97 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 4.61-4.52 (m, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.12-



4.05 (m, 1H), 3.99-3.92 (m, 1H), 3.91-3.79 (m, 2H), 3.43-3.20 (m, 2H), 3.09-2.99 (m, 1H), 2.06 (brs, 3H), 1.79-1.65 (m, 8H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.21 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  
MS (ESI)  $m/z = 512$   $[M+Na]^+$ .

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-2-methyl-4-(4-(methylcarbamoyl)phenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (60)**

**Step 1:** Methyl 4-((*R*)-4-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methylpiperazin-1-yl)benzoate (**67**, 100 mg, 0.198 mmol)를 MeOH (5 mL)에 녹인 후 2N-NaOH 수용액 (0.50 mL, 0.991 mmol)을 가하고 80°C 상에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축한 후 증류수 (10 mL)를 가해 녹이고 0°C 상에서 교반하며 1N-HCl 수용액을 가해 중화하였다. 석출된 고체를 여과한 후 진공 건조하여 4-((*R*)-4-(6-(((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methylpiperazin-1-yl)benzoic acid (72 mg, 74%)를 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 12.25 (brs, 1H), 8.31 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.78 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.73 (dd,  $J = 7.2, 8.7$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.07 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.98 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 4.61-4.52 (m, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.12-4.03 (m, 1H), 3.98-3.82 (m, 3H), 3.45-3.25 (m, 2H), 3.18-3.09 (m, 1H), 2.05 (brs, 3H), 1.80-1.64 (m, 8H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.21 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z = 491$   $[M+H]^+$ .

**Step 2:** 4-((*R*)-4-(6-(((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methylpiperazin-1-yl)benzoic acid (60 mg, 0.122 mmol)를 acetonitrile (2 mL)에 녹인 후 MeNH<sub>2</sub> (2.0 M solution in THF, 0.30 mL, 0.595 mmol) *N,N*-diisopropylethylamine (0.050 mL, 0.286 mmol), HBTU (54 mg, 0.143 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 상온에서 14시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액 (10 mL)을 가한 뒤 MC (15 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하

여 얻어진 잔사를 MPLC (5% MeOH/MC)하여 화합물 **60** (43 mg, 70%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.36 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.71 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 7.66 (dd,  $J$  = 7.2, 8.4 Hz, 1H), 7.55 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 6.90 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 6.81 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.02 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 4.60-4.53 (m, 1H), 4.24-4.18 (m, 1H), 4.10-4.02 (m, 1H), 3.87-3.79 (m, 1H), 3.73-3.66 (m, 1H), 3.53-3.43 (m, 1H), 3.34 (dd,  $J$  = 3.6, 12.0 Hz, 1H), 3.22-3.12 (m, 1H), 3.01 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 3H), 2.24 (brs, 3H), 2.01-1.93 (m, 2H), 1.89-1.78 (m, 6H), 1.67-1.56 (m, 2H), 1.33 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z$  = 504 [M+H]<sup>+</sup>.

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-4-(4-(2-hydroxypropan-2-yl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)picolinamide (**61**)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)picolinamide (**66**, 30 mg, 0.081 mmol), 2-(4-bromophenyl)propan-2-ol (21 mg, 0.097 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (1.5 mg, 0.0016 mmol), BINAP (3 mg, 0.0049 mmol), sodium tert-butoxide (12 mg, 0.122 mmol)를 toluene (1 mL)에 현탁시키고 질소기류 하 100°C 상에서 15시간 동안 교반하였다. 반응액에 증류수 (10 mL)을 가한 뒤 MC (15 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (4% MeOH/MC)하여 화합물 **61** (24 mg, 58%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 8.31 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.73 (dd,  $J$  = 7.2, 8.7 Hz, 1H), 7.32 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.10 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 4.82 (s, 1H), 4.64-4.56 (m, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.17-4.08 (m, 1H), 3.99-3.93 (m, 1H), 3.75-3.68 (m, 1H), 3.64-3.57 (m, 1H), 3.33-3.24 (m, 1H), 3.00-2.92 (m, 1H), 2.84-2.73 (m, 1H), 2.07 (brs, 3H), 1.80-1.64 (m, 8H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.39 (s, 6H), 1.24 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 163.54, 157.34, 150.04, 148.20, 141.91, 139.53, 125.71, 115.73, 111.09, 110.79, 70.81, 65.94, 54.20, 52.16, 49.08, 47.99, 45.77, 44.85, 34.05, 32.62, 31.15, 31.03, 29.66, 14.17.

MS (ESI)  $m/z$  = 487 [M-OH]<sup>+</sup>.

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-(4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**68**)**

**Step 1:** 2-Chloropyrimidine-4-carboxylic acid (500 mg, 3.154 mmol)를 2-methylpropan-2-ol (20 mL)에 현탁시킨 후 pyridine (3 mL), *p*-toluenesulfonyl chloride (1.2 g, 6.308 mmol)를 가하고 질소기류 하 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응액에 NaHCO<sub>3</sub> 포화수용액을 서서히 가해 중화한 후 감압 농축하고 증류수 (5 mL)를 가하였다. 석출된 고체를 여과한 후 진공 건조하여 *tert*-butyl 2-chloropyrimidine-4-carboxylate (**80**, 420 mg, 62%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.82 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 1.63 (s, 9H).

**Step 2:** *Tert*-butyl 2-chloropyrimidine-4-carboxylate (**80**, 70 mg, 0.326 mmol), 1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine (157 mg, 0.652 mmol)을 acetonitrile (2 mL)에 녹인 후 *N,N*-diisopropylethylamine (0.11 mL, 0.652 mmol)을 가하고 질소기류하 100°C 상에서 24시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (50% EtOAc/Hexane)하여 *tert*-butyl 2-(4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxylate (**81**, R = H, 124 mg, 91%)를 미황색 고체로 수득하였다.

MS (ESI) *m/z* = 419 [M+H]<sup>+</sup>.

**Step 3:** *Tert*-butyl 2-(4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxylate (**81**, R = H, 116 mg, 0.277 mmol)를 MC (2 mL)에 녹인 후 trifluoroacetic acid (2 mL)를 가하고 상온에서 15시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압 농축하고 진공 건조하여 얻어진 잔사를 acetonitrile (5 mL)에 현탁시킨 후 *trans*-4-aminoadamantan-1-ol (56 mg, 0.332 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (0.15 mL, 0.831 mmol), HBTU (126 mg, 0.332 mmol)를 차례로 가하고 질소기류 하 상온에서 6시간 동안 교반하였다. 반응액에 염화암모늄 포화수용액 (15 mL)을 가한 뒤 MC (20 mL x 2)로 추출하고 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조한 후 여과, 농축하여 얻어진 잔사를 MPLC (4% MeOH/MC)하여 화합물 **68** (116 mg, 82%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.57 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.22-4.16 (m, 1H), 4.04 (dd, *J* = 4.8, 5.7 Hz, 4H), 3.53 (dd, *J* = 4.8, 5.7 Hz, 4H), 3.03 (s, 3H), 2.25 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.86-1.75 (m, 6H), 1.64-1.57 (m, 2H), 1.39 (s, 1H).  
MS (ESI) *m/z* = 512 [M+H]<sup>+</sup>.

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methyl-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (69)**

**Step 1:** *Tert*-butyl 2-chloropyrimidine-4-carboxylate (**80**, 70 mg, 0.326 mmol)와 (*R*)-3-methyl-1-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazine (166 mg, 0.652 mmol)을 사용하여 화합물 **68** 합성의 Step 2와 동일한 방법에 의해 (*R*)-*tert*-butyl 2-(2-methyl-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxylate (**81**, R = Me, 120 mg, 85%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.51 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 5.07-4.98 (m, 1H), 4.61 (dt, *J* = 3.6, 13.8 Hz, 1H), 3.86-3.78 (m, 1H), 3.74-3.67 (m, 1H), 3.63-3.54 (m, 1H), 3.35 (dd, *J* = 3.6, 12.9 Hz, 1H), 3.19-3.10 (m, 1H), 3.02 (s, 3H), 1.61 (s, 9H), 1.31 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).  
MS (ESI) *m/z* = 433 [M+H]<sup>+</sup>.

**Step 2:** (*R*)-*Tert*-butyl 2-(2-methyl-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxylate (**81**, R = Me, 120 mg, 0.277 mmol)를 사용하여 화합물 **68** 합성의 Step 3와 동일한 방법에 의해 화합물 **69** (116 mg, 80%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.58 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.94-4.86 (m, 1H), 4.47 (dt, *J* = 3.9, 13.5 Hz, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.89-3.82 (m, 1H), 3.78-3.62 (m, 2H), 3.46 (dd, *J* = 3.9, 12.9 Hz, 1H), 3.30-3.21 (m, 1H), 3.03 (s, 3H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.86-1.74 (m, 6H), 1.65-1.56 (m, 2H), 1.41 (s, 1H), 1.35 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).  
MS (ESI) *m/z* = 526 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-((*R*)-4-(4-Cyanophenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (70)**

**Step 1:** *Tert*-butyl 2-chloropyrimidine-4-carboxylate (**80**, 2.06 g, 9.62 mmol)와 (*R*)-1-benzyl-3-methylpiperazine (1.83 g, 9.62 mmol)을 사용하여 화합물 **68** 합성의 *Step* 2와 동일한 방법에 의해 (*R*)-*tert*-butyl 2-(4-benzyl-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxylate (**82**, 3.34 g, 94%)를 황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.45 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 7.40-7.24 (m, 5H), 7.01 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 4.94-4.85 (m, 1H), 4.60-4.52 (m, 1H), 3.60 (d,  $J$  = 13.2 Hz, 1H), 3.43 (d,  $J$  = 13.2 Hz, 1H), 3.33-3.24 (m, 1H), 2.95-2.87 (m, 1H), 2.73 (d,  $J$  = 11.1 Hz, 1H), 2.21 (dd,  $J$  = 3.9, 11.1 Hz, 1H), 2.17-2.08 (m, 1H), 1.59 (s, 9H), 1.30 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H).

**Step 2:** (*R*)-*Tert*-butyl 2-(4-benzyl-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxylate (**82**, 3.34 g, 9.06 mmol)를 사용하여 화합물 **68** 합성의 *Step* 3와 동일한 방법에 의해 2-((*R*)-4-benzyl-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**83**, 2.83 g, 68%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.52 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 8.24 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.41-7.28 (m, 5H), 7.26 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 4.83-4.74 (m, 1H), 4.47-4.39 (m, 1H), 4.19-4.12 (m, 1H), 3.61 (d,  $J$  = 13.2 Hz, 1H), 3.48 (d,  $J$  = 13.2 Hz, 1H), 3.33-3.24 (m, 1H), 2.99-2.91 (m, 1H), 2.78 (d,  $J$  = 11.4 Hz, 1H), 2.27 (dd,  $J$  = 3.9, 11.4 Hz, 1H), 2.22-2.11 (m, 4H), 1.97-1.90 (m, 2H), 1.83-1.70 (m, 6H), 1.62-1.56 (m, 2H), 1.32 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z$  = 462 [M+H]<sup>+</sup>.

**Step 3:** 2-((*R*)-4-Benzyl-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**83**, 2.83 g, 6.13 mmol)를 사용하여 화합물 **20** 합성의 *Step* 1과 동일한 방법에 의해 *N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 1.86 g, 81%)를 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  ppm 8.58 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.89-4.81 (m, 1H), 4.56-4.48 (m, 1H), 4.08 (brs, 1H), 3.23-3.11 (m, 2H), 3.03-2.98 (m, 2H), 2.84-2.74 (m, 1H), 2.19 (brs, 3H), 1.93-1.78 (m, 8H), 1.65-1.57 (m, 2H), 1.30 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

**Step 4:** *N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 80 mg, 0.215 mmol)와 4-bromobenzonitrile (46.5 mg, 0.258 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **70** (64 mg, 63%)을 백색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.57 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 8.22 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 4.93-4.84 (m, 1H), 4.47 (dt,  $J = 3.9, 13.8$  Hz, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.86-3.77 (m, 1H), 3.74-3.60 (m, 2H), 3.43 (dd,  $J = 3.9, 12.6$  Hz, 1H), 3.27-3.18 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.86-1.74 (m, 6H), 1.64-1.57 (m, 2H), 1.45 (s, 1H), 1.35 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z = 473$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## **2-((*R*)-4-(4-Fluorophenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**71**)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 80 mg, 0.215 mmol)와 1-bromo-4-fluorobenzene (0.0283 mL, 0.258 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **71** (41 mg, 41%)을 미황색 고체로 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.57 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 8.25 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 7.03-6.89 (m, 4H), 4.98-4.88 (m, 1H), 4.62-4.53 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.61-3.53 (m, 1H), 3.50-3.39 (m, 2H), 3.04 (dd,  $J = 3.6, 12.6$  Hz, 1H), 2.90-2.81 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.86-1.75 (m, 6H), 1.64-1.57 (m, 2H), 1.44 (s, 1H), 1.40 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

MS (ESI)  $m/z = 466$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**2-((*R*)-4-(4-Chlorophenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (72)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 80 mg, 0.215 mmol)와 1-bromo-4-chlorobenzene (49.4 mg, 0.258 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **72** (65 mg, 62%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.57 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.97-4.88 (m, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.68-3.60 (m, 1H), 3.54-3.43 (m, 2H), 3.10 (dd, *J* = 3.6, 12.3 Hz, 1H), 2.96-2.87 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.85-1.75 (m, 6H), 1.64-1.57 (m, 2H), 1.39 (s, 1H), 1.38 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 482 [M+H]<sup>+</sup>.

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methyl-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (73)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 80 mg, 0.215 mmol)와 1-bromo-4-(trifluoromethyl)benzene (0.0379 mL, 0.258 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **73** (56 mg, 50%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.57 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.97-4.88 (m, 1H), 4.51 (dt, *J* = 3.6, 13.5 Hz, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.83-3.75 (m, 1H), 3.70-3.64 (m, 1H), 3.62-3.53 (m, 1H), 3.30 (dd, *J* = 3.6, 12.6 Hz, 1H), 3.15-3.06 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.85-1.75 (m, 6H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.42 (s, 1H), 1.37 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 516 [M+H]<sup>+</sup>.

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-4-(4-(2-hydroxypropan-2-yl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**74**)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 150 mg, 0.404 mmol)와 2-(4-bromophenyl)propan-2-ol (104 mg, 0.485 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **74** (97 mg, 47%)를 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.56 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.98-4.89 (m, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.74-3.66 (m, 1H), 3.56 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.51-3.42 (m, 1H), 3.09 (dd, *J* = 3.6, 12.0 Hz, 1H), 2.95-2.86 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.85-1.74 (m, 6H), 1.65 (s, 1H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.58 (s, 6H), 1.51 (s, 1H), 1.38 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 488 [M-OH]<sup>+</sup>.

**2-((*R*)-4-(2-Fluoro-4-methoxyphenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**75**)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 80 mg, 0.215 mmol)와 1-bromo-2-fluoro-4-methoxybenzene (52.9 mg, 0.258 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **75** (45 mg, 42%)를 황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.56 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.91 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.71-6.61 (m, 2H), 4.97-4.88 (m, 1H), 4.61-4.53 (m, 1H), 4.21-4.15 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.49-3.26 (m, 3H), 2.94 (dd, *J* = 3.6, 11.4 Hz, 1H), 2.89-2.80 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.85-1.76 (m, 6H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.45 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.39 (s, 1H).

MS (ESI) *m/z* = 496 [M+H]<sup>+</sup>.



**2-((*R*)-4-(2-Fluoro-4-(2-hydroxypropan-2-yl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (76)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 80 mg, 0.215 mmol)와 2-(4-bromo-3-fluorophenyl)propan-2-ol (60.1 mg, 0.258 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **76** (61 mg, 54%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.56 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 8.24 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.31 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 7.24-7.16 (m, 2H), 6.93 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 4.98-4.88 (m, 1H), 4.62-4.54 (m, 1H), 4.21-4.15 (m, 1H), 3.51-3.39 (m, 3H), 2.99 (dd,  $J$  = 3.6, 11.7 Hz, 1H), 2.92-2.83 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.86-1.76 (m, 6H), 1.73 (s, 1H), 1.64-1.58 (m, 2H), 1.57 (s, 6H), 1.44 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H), 1.43 (s, 1H).

MS (ESI)  $m/z$  = 524 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-((*R*)-4-(2-Fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (77)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 74 mg, 0.200 mmol)와 1-bromo-2-fluoro-4-(methylsulfonyl)benzene (56.1 mg, 0.240 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **77** (56 mg, 50%)을 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.58 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 8.21 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.68-7.59 (m, 2H), 7.35 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 7.05 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.02-4.92 (m, 1H), 4.64-4.56 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.69-3.58 (m, 2H), 3.54-3.44 (m, 1H), 3.18 (dd,  $J$  = 3.6, 12.0 Hz, 1H), 3.09-3.00 (m, 1H), 3.05 (s, 3H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.86-1.75 (m, 6H), 1.65-1.57 (m, 2H), 1.43 (s, 1H), 1.42 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 162.70, 160.50, 157.41, 155.00, 153.34, 145.15, 132.66, 124.70, 118.57, 115.96, 107.37, 67.44, 54.72, 52.17, 49.54, 47.26, 45.22, 44.85, 44.41, 38.90, 33.99, 30.92, 29.75, 14.51.

MS (ESI)  $m/z$  = 544 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-((*R*)-4-(2-Chloro-4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (78)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 50 mg, 0.135 mmol)와 1-bromo-2-chloro-4-(methylsulfonyl)benzene (54.4 mg, 0.202 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **78** (31 mg, 41%)을 미황색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.58 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.05-4.96 (m, 1H), 4.67-4.59 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.61-3.46 (m, 3H), 3.09-3.04 (m, 1H), 3.06 (s, 3H), 3.00-2.91 (m, 1H), 2.24 (brs, 3H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.85-1.75 (m, 6H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.47 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 560 [M+H]<sup>+</sup>.

***N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methyl-4-(2-methyl-4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (79)**

*N*-((*E*)-5-Hydroxyadamantan-2-yl)-2-((*R*)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**84**, 50 mg, 0.135 mmol)와 1-bromo-2-methyl-4-(methylsulfonyl)benzene (50.3 mg, 0.202 mmol)을 사용하여 화합물 **61**의 합성과 동일한 방법에 의해 화합물 **79** (46 mg, 63%)를 백색 고체로 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.58 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.78-7.74 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.04-4.95 (m, 1H), 4.67-4.59 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 1H), 3.52-3.43 (m, 1H), 3.33-3.26 (m, 1H), 3.24-3.17 (m, 1H), 3.08-3.03 (m, 1H), 3.05 (s, 3H), 2.95-2.86 (m, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.25 (brs, 3H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.86-1.75 (m, 6H), 1.65-1.56 (m, 2H), 1.47 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 540 [M+H]<sup>+</sup>.

## 2. 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay

11 $\beta$ -HSD1에 대한 enzyme assay는 11 $\beta$ -HSD1이 과 발현된 HEK293 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) cell의 microsomal fraction을 이용하여 수행하였다. NADPH regenerating system (BD Gentest<sup>TM</sup>; BD Biosciences, San Jose, CA)에 용해된 cofactor NADPH를 포함하는 25 mM sodium phosphate buffer 용액에 0.1 ng/ml의 cell lysate와 cortisone 및 다양한 농도의 시험 화합물을 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 incubation 하였다. Supernatant를 취한 후 cortisol enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Assay Designs, Ann Arbor, MI)를 이용하여 cortisone으로부터 전환된 cortisol의 양을 측정하였다. Half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) 값은 Prism software (GraphPad, San Diego, CA)를 이용하여 계산하였으며 sigmoidal dose-response curve fitting option을 사용하였다.

## 3. 11 $\beta$ -HSD1 cell-based assay

11 $\beta$ -HSD1 cellular assay는 human 11 $\beta$ -HSD1의 cDNA를 안정적으로 transfection 한 HEK293 cell을 NADPH 및 regenerating system의 추가적인 공급 없이 사용하여 수행하였다. HEK293 cell을 다양한 농도의 시험 화합물로 30분간 전 처리한 후 cortisone을 가하고 37°C에서 2시간 동안 incubation 하였다. 배양액을 취하여 11 $\beta$ -HSD1 enzyme assay에서와 마찬가지로 cortisol ELISA kit를 이용하여 cortisol의 양을 측정하였으며 Prism software를 이용하여 IC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

## 4. Mouse *ex vivo* pharmacodynamic assay

8주령 male C57BL/6 mouse (Charles River, Japan)를 2주 이상 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. Mouse를 4시간 동안 절식시킨 후 vehicle (0.5% methylcellulose와 1% Tween80을 포함한 멸균수) 또는 시험 화합물을 단회 경구 투여하였다. 투여 2시간 또는 6시간 후 liver 및 epididymal fat 조직을 적출하여 30~40 mg의 조각으로 잘게 나누어 1  $\mu$ M의 cortisone이 포함된 DMEM 배지에 담그며 이 때 배지의 양은 조직 중량의 3배가 되도록 하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 2시간 동안 incubation한 후

cortisol ELISA kit (Assay Designs, Ann Arbor, MI)를 이용하여 cortisol의 양을 측정하고 vehicle 투여 군의 cortisol 양 대비 상대적인 cortisol의 양으로부터 시험 화합물의 억제율을 산출하였다.

## 5. HF/STZ mouse model

3.5주령 male ICR mouse (Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan)를 사육실 환경에 적응시킨 후 4주령부터 60% kcal high fat 사료 (D12450B; Research diets, New Brunswick, NJ)를 3주간 섭취시켰다. 마우스를 6시간 동안 절식시킨 후 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.5)에 용시 조제한 streptozotocin (STZ, 90 mg/kg)을 신속하게 복강 투여하였다. STZ 투여 후 5주 동안 60% kcal high fat 사료를 지속적으로 섭취시키며 모든 개체에 대하여 일주일에 1회 체중과 혈당을 측정하고 상태를 관찰하여 동물의 선별에 반영하였다. STZ 투여 5주 후 혈당 범위가 200~400 mg/dl로 고혈당이 유발된 개체를 선별하여 측정된 혈당의 평균값이 유사하도록 군 분리한 후 vehicle (0.5% methylcellulose와 1% Tween80을 포함한 멸균수), 양성 대조물질 또는 시험 화합물을 1일 2회 경구 투여하였다. 시험 종료 시 overnight 절식 후 꼬리 정맥으로부터 blood sample을 취하여 fasting glucose (GM9 glucose analyzer; Analox Instruments, London, UK)와 insulin level (RI-13K kit; EMD Millipore, Billerica, MA)을 측정하였다.

## 6. *Ob/ob* mouse model

7주령 male *ob/ob* mouse (Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan)를 2주 동안 사육실 환경에 적응시키면서 일주일에 1회 체중과 혈당을 측정하고 상태를 관찰하여 동물의 선별에 반영하였다. 실험 시작 전 혈당 범위가 200~400 mg/dl로 고혈당이 유발된 개체를 선별하여 측정된 혈당의 평균값이 유사하도록 군 분리한 후 vehicle (0.5% methylcellulose와 1% Tween80을 포함한 멸균수) 또는 시험 화합물을 1일 1회 경구 투여하였다. 시험 종료 시 cardiac puncture를 통해 blood sample을 취하여 postprandial glucose (GM9 glucose analyzer; Analox Instruments, London, UK)와 당

화혈색소 (DCA Vantage Analyzer; Siemens Healthcare, Erlangen, Germany)를 측정하고 circulating lipid (LDL, HDL, total cholesterol, triglyceride) level의 경우 biochemical analyzer (AU480; Beckman Coulter, Brea, CA)를 이용하여 측정하였다.

## VII. 참고 문헌

1. American Diabetes Association *Diabetes Care* **2006**, 29 (Suppl. 1), S43.
2. Dwarakanathan A. *J. Insur. Med.* **2006**, 38, 20.
3. (a) International Diabetes Federation *Diabetes Atlas*, 3rd ed.; (b) International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, **2006**.
4. (a) Morton, N. M.; Paterson, J. M.; Masuzaki, H.; Holmes, M. C.; Staels, B.; Fievet, C.; Walker, B. R.; Flier, J. S.; Mullins, J. J.; Seckl, J. R. *Diabetes* **2004**, 53, 931; (b) Tomlinson, J. W.; Walker, E. A.; Bujalska, I. J.; Draper, N.; Lavery, G. G.; Cooper, M. S.; Hewison, M.; Stewart, P. M. *Endocr. Rev.* **2004**, 25, 831; (c) Seckl, J. R.; Walker, E. A. *Trends Endocrinol. Metab.* **2004**, 15, 418; (d) Stulnig, T. M.; Waldhausl, W. *Diabetologia* **2004**, 47, 1; (e) Draper, N.; Stewart, P. M. *J. Endocrinol.* **2005**, 186, 251; (f) Thieringer, R.; Hermanowski-Vosatka, A. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2005**, 3, 911.
5. (a) Andrews, R. C.; Rooyackers, O.; Walker, B. R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, 88, 285; (b) Alberts, P.; Nilsson, C.; Selen, G.; Engblom, L. O. M.; Edling, N. H. M.; Norling, S.; Klingstrom, G.; Larsson, C.; Forsgren, M.; Ashkzari, M.; Nilsson, C. E.; Fiedler, M.; Bergqvist, E.; Ohman, B.; Bjorkstrand, E.; Abrahmsen, L. B. *Endocrinology* **2003**, 144, 4755.
6. (a) Masuzaki, H.; Paterson, J.; Shinyama, H.; Morton, N. M.; Mullins, J. J.; Seckl, J. R.; Flier, J. S. *Science* **2001**, 294, 2166; (b) Masuzaki, H.; Yamamoto, H.; Kenyon, C. J.; Elmquist, J. K.; Morton, N. M.; Paterson, J. M.; Shinyama, H.; Sharp, M. G. F.; Fleming, S.; Mullins, J. J.; Seckl, J. R.; Flier, J. S. *J. Clin. Invest.* **2003**, 112, 83.
7. (a) Morton, N. M.; Holmes, M. C.; Fievet, C.; Staels, B.; Tailleux, A.; Mullins, J. J.; Seckl, J. R. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 41293; (b) Morton, N. M.; Paterson, J. M.; Masuzaki, H.; Holmes, M. C.; Staels, B.; Fievet, C.; Walker, B. R.; Flier, J. S.; Mullins, J. J.; Seckl, J. R. *Diabetes* **2004**, 53, 931.
8. (a) Kotelevtsev, Y. V.; Brown, R. W.; Fleming, S.; Kenyon, C.; Edwards, C. R. W.; Seckl, J. R.; Mullins, J. J. *J. Clin. Invest.* **1999**, 103, 683; (b) Seckl, J. S.; Walker, B. R. *Endocrinology* **2001**, 142, 1371; (c) Van Uum, S. H.; Lenders, J. W.; Hermus, A.

- R. *Semin. Vasc. Med.* **2004**, *4*, 121.
9. (a) Kotelevtsev, Y.; Brown, R. W.; Fleming, S.; Kenyon, C.; Edwards, C. R. W.; Seckl, J. R.; Mullins, J. J. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 683; (b) Andrew, R. C.; Rooyackers, O.; Walker, B. R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 285.
  10. Some of the recent publications in this field are: (a) Scott, J. S.; Goldberg, F. W.; Turnbull, A. V. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4466; (b) Li, J.; Lawrence, J. K.; Wang, H.; Li, J. J.; Walker, S. J.; Hong, Z.; O'Connor, S. P.; Nayeem, A.; Camac, D. M.; Morin, P. E.; Sheriff, S.; Wang, M.; Harper, T.; Golla, R.; Seethala, R.; Harrity, T.; Ponticello, R. P.; Morgan, N. N.; Taylor, J. R.; Zebo, R.; Gordon, D. A.; Robl, J. A. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 803; (c) Ye, X.-Y.; Yoon, D.; Chen, S. Y.; Nayeem, A.; Golla, R.; Seethala, R.; Wang, M.; Harper, T.; Slecicka, B. G.; Apedo, A.; Li, Y.-X.; Kirby, M.; Gordon, D. A.; Robl, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 654; (d) Venier, O.; Pascal, C.; Braun, A.; Namane, C.; Mougenot, P.; Crespin, O.; Pacquet, F.; Mougenot, C.; Monseau, C.; Onofri, B.; Dadjai-Faihun, R.; Leger, C.; Ben-Hassine, M.; Van-Pham, T.; Ragot, J.-L.; Philippo, C.; Farjot, Geraldine; Noah, L.; Maniani, K.; Boutarfa, A.; Nicolai, E.; Guillot, E.; Pruniaux, M.-P.; Gussregen, S.; Engel, C.; Coutant, A.-L.; de Miguel, B.; Castro, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2414; (e) Bohme, T.; Engel, C. K.; Farjot, G.; Gussregen, S.; Haack, T.; Tschank, G.; Ritter, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4685; (f) Hofer, S.; Kratschmar, D. V.; Scherthanner, B.; Vuorinen, A.; Schuster, D.; Odermatt, A.; Easmon, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5397; (g) Goldberg, F. W.; Leach, A. G.; Scott, J. S.; Snelson, W. L.; Groombridge, S. D.; Donald, C. S.; Bennett, S. N. L.; Bodin, C.; Gutierrez, P. M.; Gyte, A. C. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10652; (h) Scott, J. S.; deSchoolmeester, J.; Kilgour, E.; Mayers, R. M.; Packer, M. J.; Hargreaves, D.; Gerhardt, S.; Ogg, D. J.; Rees, A.; Selmi, N.; Stocker, A.; Swales, J. G.; Whittamore, P. R. O. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10136.
  11. (a) Bhat, B. G.; Hosea, N.; Fanjul, A.; Herrera, J.; Chapman, J.; Thalacker, F.; Stewart, P. M.; Rejto, P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *324*, 299; (b) Courtney, R.; Stewart, P. M.; Toh, M.; Ndong, M.; Calle, R. A.; Hirshberg, B. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 550; (c) Siu, M.; Johnson, T. O.; Wang, Y.; Nair, S. K.; Taylor, W.

- D.; Cripps, S. J.; Matthews, J. J.; Edwards, M. P.; Pauly, T. A.; Ermolieff, J.; Castro, A.; Hosea, N. A.; LaPaglia, A.; Fanjul, A. N.; Vogel, J. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3493.
12. Olson, S.; Aster, S. D.; Brown, K.; Carbin, L.; Graham, D. W.; Hermanowski-Vosatka, A.; LeGrand, C. B.; Mundt, S. S.; Robbins, M. A.; Schaeffer, J. M.; Slossberg, L. H.; Szymonifka, M. J.; Thieringer, R.; Wright, S. D.; Balkovec, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4359.
  13. (a) Xu, Z.; Tice, C. M.; Zhao, W.; Cacatian, S.; Ye, Y.-J.; Singh, S. B.; Lindblom, P.; McKeever, B. M.; Krosky, P. M.; Kruk, B. A.; Berbaum, J.; Harrison, R. K.; Johnson, J. A.; Bukhtiyarov, Y.; Panemangalore, R.; Scott, B. B.; Zhao, Y.; Bruno, J. G.; Togias, J.; Guo, J.; Guo, R.; Carroll, P. J.; McGeehan, G. M.; Zhuang, L.; He, W.; Claremon, D. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6050; (b) Hamilton, B. S.; Himmelsbach, F.; Nar, H.; Schuler-Metz, A.; Krosky, P.; Guo, J.; Guo, R.; Meng, S.; Zhao, Y.; Lala, D. S.; Zhuang, L.; Claremon, D. A.; McGeehan, G. M. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *746*, 50.
  14. Veniant, M. M.; Hale, C.; Hungate, R. W.; Gahm, K.; Emery, M. G.; Jona, J.; Joseph, S.; Adams, J.; Hague, A.; Moniz, G.; Zhang, J.; Bartberger, M. D.; Li, V.; Syed, R.; Jordan, S.; Komorowski, R.; Chen, M. M.; Cupples, R.; Kim, K. W.; St. Jean, D. J., Jr; Johansson, L.; Henriksson, M. A.; Williams, M.; Vallgarda, J.; Fotsch, C.; Wang, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4481.
  15. Scott, J. S.; Bowker, S. S.; deSchoolmeester, J.; Gerhardt, S.; Hargreaves, D.; Kilgour, E.; Lloyd, A.; Mayers, R. M.; Mc Coull, W.; Newcombe, N. J.; Ogg, D.; Packer, M. J.; Rees, A.; Revill, J.; Schofield, P.; Selmi, N.; Swales, J. G.; Whittamore, P. R. O. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5951.
  16. Rosenstock, J.; Banarer, S.; Fonseca, V. A.; Inzucchi, S. E.; Sun, W.; Yao, W.; Hollis, G.; Flores, R.; Levy, R.; Williams, W. V.; Seckl, J. R.; Huber, R. *Diabetes Care* **2010**, *33*, 1516.
  17. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov): august 4th, **2010**.
  18. (a) Feig, P. U.; Shah, S.; Hermanowski-Vosatka, A.; Plotkin, D.; Springer, M. S.; Donahue, S.; Thach, C.; Klein, E. J.; Lai, E.; Kaufman, K. D. *Diabetes Obes. Metab.* **2011**, *13*, 498; (b) Shah, S.; Hermanowski-Vosatka, A.; Gibson, K.; Ruck, R. A.; Jia,



- G.; Zang, J.; Hwang, P. M. T.; Ryan, N. W.; Langdon, R. B.; Feig, P. U. *J. Am. Soc. Hypertens.* **2011**, *5*, 166.
19. Venier, O.; Pascal, C.; Braun, A.; Namane, C.; Mougenot, P.; Crespin, O.; Pacquet, F.; Mougenot, C.; Monseau, C.; Onofri, B.; Dadji-Faihun, R.; Leger, C.; Ben-Hassine, M.; Van-Pham, T.; Ragot, J.-L.; Philippo, C.; Farjot, G.; Noah, L.; Maniani, K.; Boutarfa, A.; Nicolai, E.; Guillot, E.; Pruniaux, M.-P.; Güssregen, S.; Engel, C.; Coutant, A.-L.; de Miguel, B.; Castro, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2414.
  20. (a) Hale, C.; Wang, M. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 702; (b) Morgan, S. A.; Tomlinson, J. W. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2010**, *19*, 1067; (c) Sun, D.; Wang, M.; Wang, Z. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1464.
  21. (a) Xie, W.; Uppal, H.; Saini, S. P. S.; Mu, Y.; Little, J. M.; Radominska-Pandya, A.; Zemaitis, M. A. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 442; (b) Fotsch, C.; Bartberger, M. D.; Bercot, E. A.; Chen, M.; Cupples, R.; Emery, M.; Fretland, J.; Guram, A.; Hale, C.; Han, N.; Hickman, D.; Hungate, R. W.; Hayashi, M.; Komorowski, R.; Liu, Q.; Matsumoto, G.; JeanJr., D. J. S.; Ursu, S.; Véniant, M.; Xu, G.; Ye, Q.; Yuan, C.; Zhang, J.; Zhang, X.; Tu, H.; Wang, M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7953.
  22. (a) Watkins, R. E.; Wisely, G. B.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Lambert, M. H.; Williams, S. P.; Willson, T. M.; Kliewer, S. A.; Redinbo, M. R. *Science* **2001**, *292*, 2329; (b) Ekins, S.; Erickson, J. A. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 96.
  23. Wang, H.; Ruan, Z.; Li, J. J.; Simpkins, L. M.; Smirk, R. A.; Wu, S. C.; Hutchins, R. D.; Nirschl, D. S.; Kirk, K. V.; Cooper, C. B.; Sutton, J. C.; Ma, Z.; Golla, R.; Seethala, R.; Salyan, M. E. K.; Nayeem, A.; Krystek, S. R.; Sheriff, S.; Camac, D. M.; Morin, P. E.; Carpenter, B.; Robl, J. A.; Zahler, R.; Gordona, D. A.; Hamanna, L. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3168.
  24. Dibble, D. J.; Ziller, J. W.; Woerpel, K. A. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7706.
  25. McMin, D. L.; Rew, Y.; Sudom, A.; Caille, S.; DeGraffenreid, M.; He, X.; Hungate, R.; Jiang, B.; Jaen, J.; Julian, L. D.; Kaizerman, J.; Novak, P.; Sun, D.; Tu, H.; Ursu, S.; Walker, N. P. C.; Yan, X.; Ye, Q.; Wang, Z.; Powers, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1446.
  26. Jagdmann, G. E.; Munson, H. R.; Gero, T. W. *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 1203.

27. Johansson, L.; Fotsch, C.; Bartberger, M. D.; Castro, V. M.; Chen, M.; Emery, M.; Gustafsson, S.; Hale, C.; Hickman, D.; Homan, E.; Jordan, S. R.; Komorowski, R.; Li, A.; McRae, K.; Moniz, G.; Matsumoto, G.; Orihuela, C.; Palm, G.; Ve'niant, M.; Wang, M.; Williams, M.; Zhang, J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2933.
28. Hermanowski-Vosatka, A.; Balkovec, J. M.; Cheng, K.; Chen, H. Y.; Hernandez, M.; Koo, G. C.; LeGrand, C. B.; Li, Z.; Metzger, J. M.; Mundt, S. S.; Noonan, H.; Nunes, C. N.; Olson, S. H.; Pikounis, B.; Ren, N.; Robertson, N.; Schaeffer, J. M.; Shah, K.; Springer, M. S.; Strack, A. M.; Strowski, M.; Wu, K.; Wu, T.; Xiao, J.; Zhang, B. B.; Wright, S. D.; Thieringer, R. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 517.
29. Ji, J.; Li, T.; Bunnelle, W. H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4611.
30. Lakshminarayana, N.; Prasad, Y. R.; Gharat, L.; Thomas, A.; Narayanan, S.; Raghuram, A.; Srinivasan, C. V.; Gopalan, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3709.
31. (a) Paul R. Eastwood, P. R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3705; (b) Bursavich, M. G.; West, C. W.; Rich, D. H. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2317.
32. (a) Sun, D.; Wang, Z.; Di, Y.; Jaen, J. C.; Labelle, M.; Ma, J.; Miao, S.; Sudom, A.; Tang, L.; Tomooka, C. S.; Tu, H.; Ursu, S.; Walker, N.; Yan, X.; Ye, Q.; Powers, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3513; (b) Xiang, J.; Wan, Z.-K.; Li, H.-Q.; Ipek, M.; Binnun, E.; Nunez, J.; Chen, L.; McKew, J. C.; Mansour, T. S.; Xu, X.; Suri, V.; Tam, M.; Xing, Y.; Li, X.; Hahm, S.; Tobin, J.; Saiah, E. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4068.
33. (a) Moritoh, Y.; Takeuchi, K.; Asakawa, T.; Kataoka, O.; Odaka, H. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *602*, 448; (b) Schuermann, C.; Linke, A.; Engelmann-Pilger, K.; Steinmetz, C.; Mark, M.; Pfeilschifter, J.; Klein, T.; Frank, S. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2012**, *342*, 71; (c) Gembardt, F.; Bartaun, C.; Jarzebska, N.; Mayoux, E.; Todorov, V. T.; Hohenstein, B.; Hugo, C. *Am. J. Physiol.* **2014**, *307*, F317.
34. (a) Kunze, K. L.; Trager, W. F. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, *24*, 429; (b) Yan, Z.; Caldwell, G. W. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1*, 403.
35. (a) Finlayson, K. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *500*, 129; (b) Sanguinetti, M. C.; Mitcheson, J. S. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 119.
36. (a) Riley, R. J.; Parker, A. J.; Trigg, S.; Manners, C. N. *Pharmaceut. Res.* **2001**, *18*,

- 652; (b) Revesz, L.; Di Padova, F. E.; Buhl, T.; Feifel, R.; Gram, H.; Hiestand, P.; Manning, U.; Zimmerlin, A. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1261; (C) Ashwell, M. A.; Lapierre, J.-M.; Kaplan, A.; Li, J.; Marr, C.; Yuan, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2025.
37. (a) Vaz, R. J.; Li, Y.; Rampe, D. *Progr. Med. Chem.* **2005**, *43*, 1; (b) Sun, D.; Wang, Z.; Cardozo, M.; Choi, R.; Degraffenreid, M.; Di, Y.; He, X.; Jaen, J. C.; Labelle, M.; Liu, J.; Ma, J.; Miao, S.; Sudom, A.; Tang, L.; Tu, H.; Ursu, S.; Walker, N.; Yan, X.; Ye, Q.; Powers, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1522.
38. Suich, D. J.; Mousa, S. A.; Singh, G.; Liapakis, G.; Reisine, T.; Degrado, W. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2229.
39. (a) Wan, Z.-K.; Chenail, E.; Xiang, J.; Li, H.-Q.; Ipek, M.; Bard, J.; Svenson, K.; Mansour, T. S.; Xu, X.; Tian, X.; Suri, V.; Hahm, S.; Xing, Y.; Johnson, C. E.; Li, X.; Qadri, A.; Panza, D.; Perreault, M.; Tobin, J. F.; Saiah, E. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5449; (b) Wan, Z.-K.; Chenail, E.; Li, H.-Q.; Kendall, C.; Wang, Y.; Gingras, S.; Xiang, J.; Massefski, W. W.; Mansour, T. S.; Saiah, E. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7048.
40. (a) LeCluyse, E. L. *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *134*, 283; (b) Chrencik, J. E.; Orans, J.; Moore, L. B.; Xue, Y.; Peng, L.; Collins, J. L.; Wisely, G. B.; Lambert, M. H.; Klierer, S. A.; Redinbo, M. R. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 1125.
41. (a) American Diabetes Association *Diabetes Care* **2007**, *30* (Suppl. 1), S4; (b) The International Expert Committee *Diabetes Care* **2009**, *32*, 1327.
42. (a) Bennett, W. L.; Maruthur, N. M.; Singh, S.; Segal, J. B.; Wilson, L. M.; Chatterjee, R.; Marinopoulos, S. S.; Pahan, M. A.; Ranasinghe, P.; Block, L.; Nicholson, W. K.; Hutfless, S.; Bass, E. B.; Bolen, S. *Ann. Intern. Med.* **2011**, *154*, 602; (b) Inzucchi, S. E.; Bergenstal, R. M.; Buse, J. B.; Diamant, M.; Ferrannini, E.; Nauck, M.; Peters, A. L.; Tsapas, A.; Wender, R.; Matthews, D. R. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 1364.

## Abstract

11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1) is a key enzyme that acts as an NADPH-dependent reductase and converts inactive cortisone into active cortisol, which is an actual circulating glucocorticoid in humans. 11 $\beta$ -HSD1 is highly expressed in several specific tissues, such as the liver, adipose, and brain. Therefore, 11 $\beta$ -HSD1 regulates the tissue-specific glucocorticoid levels. Elevated levels of glucocorticoids in the liver and adipose tissue can lead to glucose intolerance, insulin resistance, enhanced hepatic gluconeogenesis, and increased lipolysis. Due to the close relationship between glucocorticoids and metabolic disease risk factors, 11 $\beta$ -HSD1 inhibition has been regarded as a potential strategy for the treatment of metabolic syndrome and type 2 diabetes.

To develop a novel 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor for the potential treatment of type 2 diabetes, high throughput screening of an in-house compound library was performed, and an initial hit compound, *N*-cyclohexyl-6-(piperidin-1-yl)picolinamide (**1**) was identified. Based on the docking results of compound **1**, structural modifications of cyclohexyl and piperidine rings were performed as hit-to-lead program and resulted in a significant improvement of both the potency and metabolic stability. High potency toward 11 $\beta$ -HSD1 was achieved by the incorporation of a hydroxy-adamantyl group. In addition, the replacement of piperidine ring with 1-(4-substituted phenyl)piperazine led to a substantial improvement in metabolic stability. The selected lead compound, 6-(4-(4-cyanophenyl)piperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)picolinamide (**25**) was efficacious in a mouse ex vivo pharmacodynamic (PD) model and reduced the fasting blood glucose and insulin levels in a HF/STZ mouse model after oral dosing.

However, a high-dose and twice daily administration of compound **25** was necessary for this in vivo efficacy due to the poor oral bioavailability and short duration of the PD activity. To improve both the potency and pharmacokinetic (PK) profiles of **25**, further optimization of the *N*-phenylpiperazine moiety was performed. The replacement of the cyano group at the 4-position of the phenyl ring with a methylsulfonyl group resulted in an approximately two-fold increase in the biochemical and cellular potencies. Further modifying the piperazine ring by introducing an (*R*)-methyl group substantially improved

the PK/PD property and cellular potency. This advanced lead compound, *N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)-6-((*R*)-2-methyl-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)piperazin-1-yl)picolinamide (**57**) demonstrated good in vivo efficacy in *ob/ob* mice and reduced the blood glucose, LDL cholesterol, and triglyceride levels, even when administered only once per day.

Despite its high potency and significantly improved PK/PD profile, compound **57** also exhibited moderate-to-strong inhibitory activity against hERG channel and CYP3A4. In order to diminish the hERG and CYP liability, we planned to reduce the basicity of the heterocyclic amine by modifying the picolinamide core. The replacement of the pyridine ring of **57** with pyrimidine ring led to a slight decrease in the cellular potency and PD activity which were, however, substantially improved by introducing an additional fluoro group at the 2-position of the phenyl ring. This compound, 2-((*R*)-4-(2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-*N*-((*E*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (**77**) was identified as a novel potent and selective inhibitor of 11 $\beta$ -HSD1 with an improved hERG profile and no CYP and PXR liabilities. **77** also exhibited excellent PK profiles across species and highly potent and sustainable PD activity which was three times superior to that of **57**. Finally, compound **77** significantly reduce the blood glucose and HbA1c levels, and improved the lipid profiles in *ob/ob* mice after oral administration. Moreover, these efficacies of **77** were synergistically enhanced by combination with metformin.

Compound **77** was selected as a preclinical candidate for GLP compliant toxicological studies and expected to be developed as a novel anti-diabetic drug, having advantages such as improvement of lipid profiles in addition to effective reduction of blood glucose level, through clinical trials.

---

**Key words:** 11 $\beta$ -HSD1, Glucocorticoid, Cortisol, Type 2 diabetes, Metabolic syndrome, Hyperlipidemia, Picolinamide, Pyrimidine-4-carboxamide, Structure-activity relationship, Metabolic stability, Pharmacodynamic, Pharmacokinetic, CYP inhibition, hERG blocking, PXR activation, *Ob/ob* mice.

**Student Number:** 2007-30460